

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Felix Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Water and Salt Research Center
und dem Institut für Anatomie der Universität Aarhus, Dänemark,
dem Institut für klinische Medizin des Universitätsklinikums Aarhus,
Dänemark und dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Dysregulation renaler Salztransporter in mit Gentamicin behandelten Ratten



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Martin Christian Sassen
aus Frankfurt am Main

Marburg an der Lahn, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am: 28.03.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
Referent:	Prof. Dr. med. Günter Klaus
1. Korreferent:	Prof. Dr. med. Joachim Hoyer

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Aminoglycosidantibiotika	7
1.2 Salztransport der Niere	8
1.3 Magnesium- und Calciumtransport in der Henle-Schleife	11
1.4 Calcium- Sensing Rezeptor	11
2. Zielsetzung	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Protokolle der Tierexperimente	15
3.2 Clearancestudien und Uringlukosemessung	17
3.3 Semiquantitative Western Blot-Analysen	18
3.4 Immunhistochemie	19
3.5 Primäre Antikörper	21
3.6 Statistiken	22
4. Ergebnisse	23
4.1 Gentamicin senkt die Urinkonzentration und steigert die Ausscheidung von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium	23
4.2 Renale Expression von NKCC2	26
4.3 Renale Expression von NHE3	29
4.4 Renale Expression der Na-K-ATPase	32
4.5 Renale Expression von NCC	32
4.6 Renale Expression von ROMK	32
4.7 Renale Expression des CaSR	36
4.8 Renale Expression von ENaC (α -, β -, γ -Untereinheit)	38

5 . Diskussion	41
5.1 Gentamicin vermindert die Urinkonzentration und steigert die Ausscheidung von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium	42
5.2 Dysregulation renaler Salztransporter und des Calcium-Sensing Rezeptors im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife	43
5.3 Verminderte Urinkonzentration in mit Gentamicin behandelten Ratten	46
5.4 Dysregulation renaler Salztransporter und des Calcium-Sensing Rezeptors im Kortex	47
6. Schlussfolgerung	49
7. Zusammenfassung	50
8. Abstract	52
9. Literaturverzeichnis	53
10. Abbildungsverzeichnis	60
11. Tabellenverzeichnis	61
12. Abkürzungen	62
13. Publikationsliste	64

14. Anhang	66
14.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer	66
14.2 Lebenslauf	67
14.3 Danksagung	69
14.4 Ehrenwörtliche Erklärung	71

1. Einleitung:

1.1 Aminoglycosidantibiotika:

Aminoglycosidantibiotika werden im klinischen Alltag häufig angewandt. Wegen ihrer chemischen Stabilität, des bakteriziden Effektes und der synergistischen Wirkung mit Betalaktam-Antibiotika sind sie gut wirksam. Außerdem ist ihre Anwendung kostengünstig. Gentamicin ist ein Vertreter der Aminoglycosidantibiotika und wird unter anderem bei der Behandlung schwerer bakterieller Infektionen der Lunge, des Abdomens oder des Urogenitaltraktes eingesetzt.

Häufige Probleme, und damit dosislimitierende Faktoren bei der Anwendung von Aminoglycosiden, sind die bekannten Nebenwirkungen: Mit einer Inzidenz von bis zu 20% werden vor allem Nephro- und Ototoxizität beobachtet, da Aminoglycosidantibiotika insbesondere in der Niere und im Innenohr akkumulieren [Bennett 1997, Palmer et al. 2003]. Aminoglycoside haben eine geringe Plasmaproteinbindung (<10%) und werden frei glomerulär filtriert [Kaloyanides 1984], ohne im Körper metabolisiert zu werden. Etwa 10% des parenteral verabreichten Antibiotikums akkumuliert im Nierenkortex. Dort verursachen Aminoglycoside eine Schädigung der Zellen des proximalen Tubulus. Dazu gehören sowohl strukturelle Veränderungen als auch funktionelle Beeinträchtigungen der Plasmamembranen, Mitochondrien und Lysosomen [Lopez-Novoa et al. 2011, Mingeot-Leclercq et al. 1999]. Nachdem die Aminoglycosidantibiotika, also auch Gentamicin, glomerulär filtriert wurden, werden sie ausschließlich in den Epithelzellen des proximalen Tubulus, insbesondere im S1 und S2 Segment, aber nicht in den distalen Abschnitten des Nephrons retiniert [Silverblatt et al. 1979, Vandewalle et al. 1981].

Die nephrotoxische Wirkung von Aminoglycosidantibiotika äußert sich nach mehrtägiger Gabe klinisch durch einen progredienten Kreatininanstieg im Serum und eine verminderte Harnkonzentrationsfähigkeit der Niere. Das Nierenversagen ist meist nicht oligurisch, oft sogar polyurisch. Des Weiteren kann es durch Aminoglycosidantibiotika zu einer vermehrten Ausscheidung von Aminosäuren, Glukose, Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium kommen. Insbesondere eine dosisabhängige Hypermagnesiurie wird frühzeitig nach dem Start einer Behandlung mit Aminoglycosiden beobachtet und ist reversibel, sobald die Aminoglycosidgaben beendet werden [Alexandridis et al. 2003, Parsons et al. 1997]. Vorangegangene Studien an Ratten zeigen, dass bereits 30 Minuten nach der Perfusion einer Niere mit Gentamicin bzw. drei Stunden nachdem Ratten Gentamicin verabreicht wurde, eine gesteigerte Ausscheidung von Magnesium und Calcium im Urin beobachtet werden kann. Die Ratten haben eine Hypomagnesiämie und Hypocalciämie lange bevor andere Zeichen der Nephrotoxizität erkennbar sind oder gar strukturelle Nierenschädigungen sichtbar werden [Lopez-Novoa et al. 2011].

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für den renalen Verlust von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium durch Gentamicin wurden zuvor noch nicht untersucht.

1.2 Salztransport in der Niere:

Die renale Salzreabsorption erfolgt größten Teils im proximalen Tubulus. Dort werden circa zwei Drittel des glomerulär filtrierten Salzes rückresorbiert. Apikal erfolgt der Salztransport hauptsächlich über den Typ 3 Na^+ / H^+ Austauscher (NHE3) [Aronson et al. 1996], aber auch über den Typ 2 Na-P_i Kotransporter [Biber et al. 1996, Murer et al. 1998] (Abbildung 1 und Abbildung 3). Wie in allen renalen Tubulussegmenten ist auch im proximalen Tubulus die Na-K-

ATPase basolateral stark exprimiert [Kashgarian et al. 1998] und spielt eine wichtige Rolle für die Salzreabsorption entlang des Nephrons (Abbildung 2 und Abbildung 3).

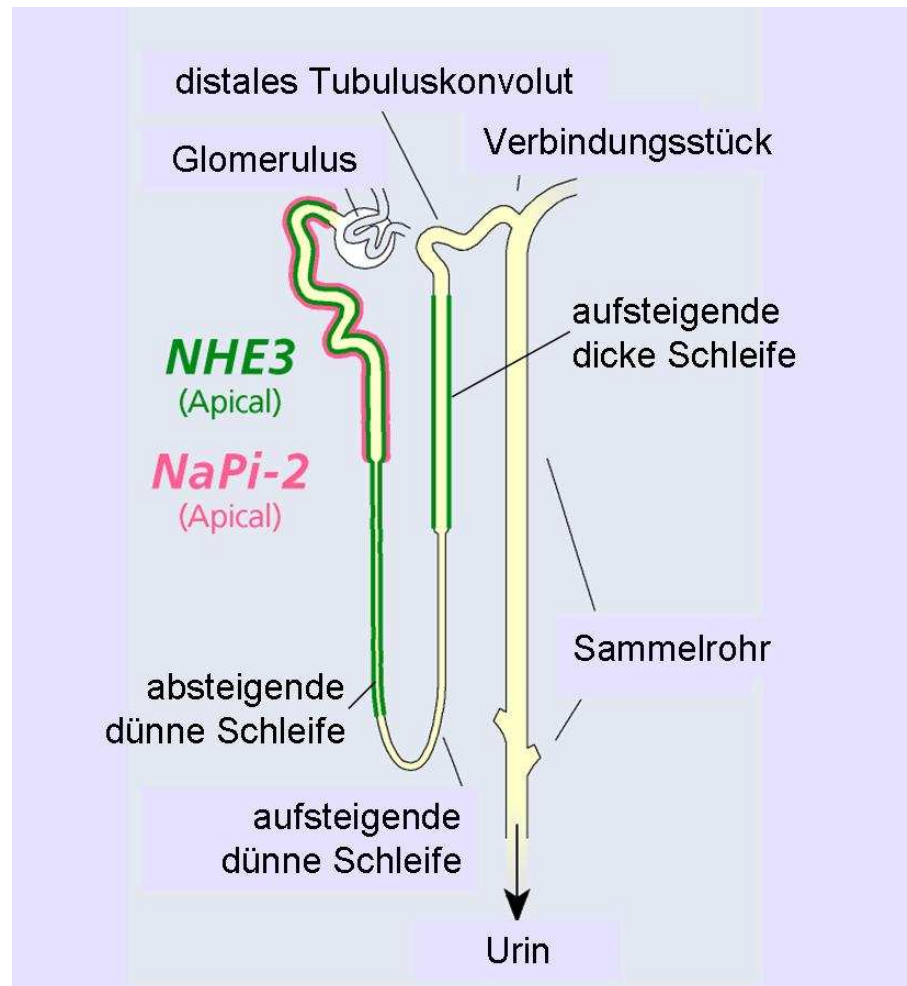


Abbildung 1: Expression von NHE3 und NaPi-2 entlang des Nephrons.

Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) sind folgende Salztransporter die Schlüsselproteine für die aktive Salzurückresorption: Der Bumetanid- bzw. Furosemid-sensitive Na-K-2Cl Kotransporter (NKCC2) [Ecelbarger et al. 1996, Nielsen et al. 1998, Xu et al. 1994], der NHE3 und die Na-K-ATPase. Kaliumionen rezirkulieren über den apikalen Kaliumkanal Kir 1.1 (ROMK) in das Tubuluslumen [Giebisch et al. 1996, Hebert et al. 1997]. Chlorid wird basolateral durch die ClC-Kb Chloridkanäle reabsorbiert [Waldegger

et al. 2000]. Durch das Zusammenspiel von NKCC2, ROMK, ClC-Kb und der Na-K-ATPase entsteht im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife ein transepitheliales lumen-positives Spannungsgefälle. Dieses Spannungsgefälle fördert die passive Rückresorption von Magnesium und Calcium in diesem Tubulusabschnitt (Abbildung 3).

Im distalen Tubuluskonvolut (DCT) erfolgt die Salzreabsorption apikal über den Thiazid-sensitiven Na-Cl Kotransporter (NCC) [Obermuller et al. 1995, Kim et al. 1998] (Abbildung 3).

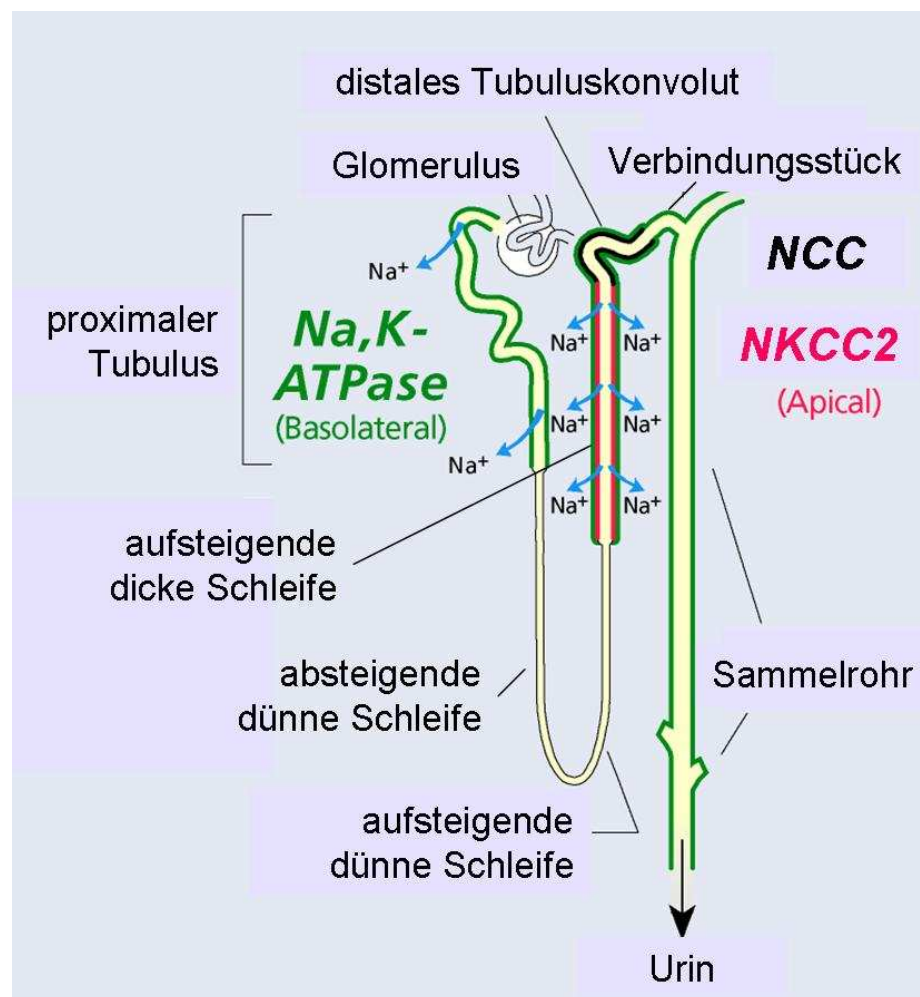


Abbildung 2: Expression der Na-K-ATPase, NKCC2 und NCC entlang des Nephrons.

Im Sammelrohr wird Natrium elektrogen (also ohne Chlorid) durch den apikalen (epithelialen) Natrium-Ionenkanal ENaC vom Tubuluslumen in die Zelle transportiert [Duc et al. 1994]. An der basolateralen Plasmamembran pumpt die Na-K-ATPase Natrium aus der Zelle in das extrazelluläre Interstitium und liefert somit die Antriebskraft für die apikale Natriumreabsorption. An Rattennieren konnte gezeigt werden, dass drei homologe Untereinheiten (α , β und γ) für das funktionelle ENaC Protein wichtig sind [Canessa et al. 1994]. Sie sind exprimiert im späten distalen Konvolut, dem Verbindungsstück (CNT) und dem kortikalen (CCD) sowie äußeren medullären Sammelrohr (OMCD). Im inneren medullären Sammelrohr ist ihre Expression geringer [Hager et al. 2001, Schmitt et al. 1999].

1.3 Magnesium- und Calciumtransport in der Henleschen

Schleife:

Die Niere spielt eine entscheidende Rolle für die Magnesiumhomöostase. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife wird ein Großteil, circa 70%, des glomerulär filtrierten Magnesiums rückresorbiert. Der Anteil des hier reabsorbierten Calciums beträgt circa 20%. Der Magnesium- und Calciumtransport erfolgt passiv, angetrieben vom lumen-positiven transepithelialen Spannungsgefälle. Zusammen mit Calcium wird Magnesium über das Tight Junction Protein Paracellin-1 (Claudin 16) reabsorbiert [Schlingmann et al. 2004] (Abbildung 3).

1.4 Calcium- Sensing Rezeptor:

Aminoglycosidantibiotika, darunter auch Gentamicin, sind funktionell polyvalente Kationen und somit in der Lage den Calcium-Sensing Rezeptor (CaSR) zu aktivieren [McLarnon et al. 2002]. Der CaSR ist

ein großes Glycoprotein und gehört zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife ist der CaSR stark in der basolateralen Plasmamembran exprimiert [Riccardi et al. 1998] (Abbildung 3). Er wird durch extrazelluläres Calcium, Magnesium und andere polyvalente Kationen, wie zum Beispiel Aminoglycoside, aktiviert. Die Lokalisation des CaSR in der Niere lässt vermuten, dass er die Magnesium- und Calciumhomöostase durch die Regulierung der renalen Magnesium- und Calciumreabsorption bzw. -exkretion direkt beeinflussen kann. Darüber hinaus gibt es Belege für eine Verbindung zwischen dem Metabolismus von divalenten Kationen und Wasser (und Natrium). Eine Aktivierung des CaSR könnte über eine Hemmung der hormonstimulierten Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und/oder anderen Calcium-abhängigen Signalmechanismen die Natriumchlorid- und Wasserreabsorption im dicken Teil der Henle-Schleife und im Sammelrohr beeinträchtigen [Hebert et al. 1997, Sands et al. 1997].

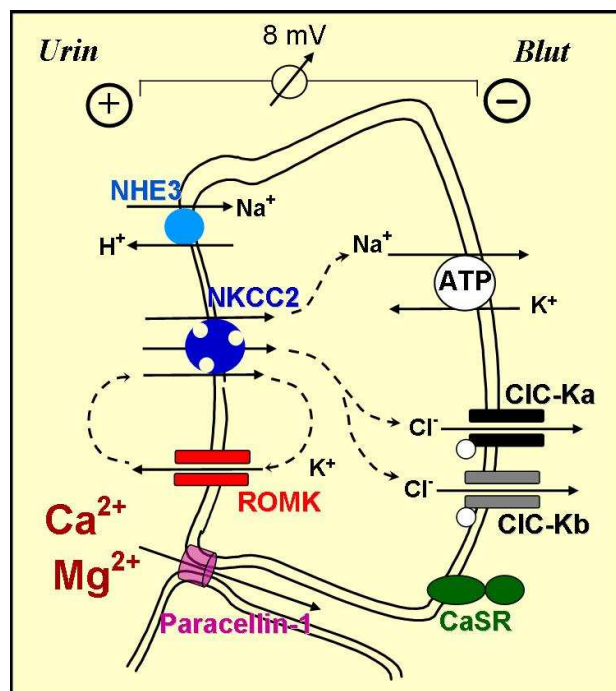


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transportmechanismen im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL).

2. Zielsetzung:

Ziel dieses Forschungsprojektes war es, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der herabgesetzten Harnkonzentrationsfähigkeit der Niere und des renalen Verlustes von Natriumchlorid, Magnesium und Calcium in Verbindung mit Gentamicin aufzuzeigen.

Insbesondere überprüften wir die Hypothese, dass Gentamicin eine herabgesetzte Expression von NKCC2 verursacht. Dies wiederum bewirkt eine Reduktion des lumen-positiven transepithelialen Spannungsgefälles im dicken Teil der Henle-Schleife und folglich eine verminderte passive parazelluläre Reabsorption von Magnesium und Calcium in diesem Teil des Nephrons.

Diese Hypothese ist vereinbar mit dem klinisch und experimentell zu beobachtenden renalen Verlust von Magnesium und Calcium durch die Gabe eines Schleifendiuretikums wie zum Beispiel Furosemid (pharmakologische Hemmung des NKCC2) [Quamme 1981].

Um diese Hypothese zu überprüfen, führten wir zwei Tierexperimente durch. Im ersten Tiermodell verwendeten wir eine relativ hohe Dosis von Gentamicin (80 mg/kg/d), die dafür bekannt ist eine Schädigung des proximalen Tubulus zu verursachen und unter anderem mit einer Glukosurie einhergeht. In einem zweiten Tiermodell verabreichten wir eine moderate Gentamicindosis (40 mg/kg/d). Frühere Studien zeigten, dass es bei dieser Dosierung zu keiner Glukosurie, aber weiterhin (wie auch im ersten Tiermodell) zu einer gesteigerten Exkretion von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium sowie zu einer verminderten Konzentration des Urins kommt.

Insbesondere suchten wir nach möglichen Veränderungen:

1. Der Expression der wichtigsten renalen Salztransporter entlang des Nephrons und des Sammelrohrs: NKCC2, NHE3, Na-K-ATPase, NCC und ENaC (α -, β - und γ -Untereinheit).
2. Der Expression von ROMK und des Calcium-Sensing Rezeptors, insbesondere im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife.
3. Der Exkretion von Natrium, Magnesium und Calcium im Urin sowie der Urinkonzentration.

3. Material und Methoden:

3.1 Protokolle der Tierexperimente:

Die Tierexperimente wurden geprüft und bewilligt von den jeweiligen Ausschüssen des Institutes für Anatomie und des Institutes für klinische Medizin der Universität Aarhus, Dänemark, gemäß der vom dänischen Justizministerium erteilten Lizenz für die Durchführung von Tierexperimenten.

Protokoll 1:

Für die Tierexperimente verwendeten wir männliche Hannover-Wistar Ratten (225-226 g, Møllegaard Breeding Centre, Ry, Dänemark). Beginnend mit Tag 1 injizierten wir Gentamicin ($n=10$) einmal täglich intramuskulär über sieben Tage (1×80 mg/kg Körpergewicht/d, Hexamycin, Durascan Mediacal Products A/S, Odense, Dänemark, Vnr. 089540). Die Kontrollratten ($n=7$) erhielten nur das Vehiculum (i.e. steriles NaCl 0,9%, intramuskulär).

Alle Ratten wurden mit einem Standardnagetierfutter gefüttert (Altromin No. 1324, Lage, Deutschland) und hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser. In der Kontrollgruppe erhielten die Ratten die Menge Futter, die der mittleren Nahrungsmenge des Vortages der mit Gentamicin behandelten Ratten entsprach (so genanntes „pair-feeding“). Dadurch wurde die Menge der aufgenommenen Nahrung zwischen den beiden Gruppen angepasst.

Die Ratten wurden während des gesamten Experimentes in Stoffwechselkäfigen gehalten (Abbildung 4). Somit konnten wir die Urinausscheidung sowie die Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme über 24 Stunden quantifizieren. Ebenfalls ermöglichte diese Haltung das Sammeln von Urinproben zum Messen von Na^+ , K^+ , Cl^- , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} gesamt, Kreatinin, Harnstoff, Osmolalität und Glukose. Das Körpergewicht der Ratten wurde täglich dokumentiert.



Abbildung 4: Stoffwechselkäfig („metabolic cage“), in dem eine Ratte gehalten wird. Die Ratte sitzt auf einem Gitter. Durch ein besonderes Trichtersystem können Urin und Stuhl separat aufgefangen werden. So kann die Ausscheidungsmenge bestimmt, sowie Proben für weitere Analysen gewonnen werden. Durch den Futtercontainer mit Nagetiernahrung in Pulverform und die Wasserflasche mit Auffangbehälter kann die Nahrungs- und Wasseraufnahme abgemessen werden.

Sieben Tage nach Behandlungsbeginn mit Gentamicin bzw. Vehiculum wurden die Ratten getötet, um Proben für Western Blots und Immunhistochemie zu erhalten. Alle Ratten wurden mit Isofluran (Forane, Abbott Laboratories, Gentofte, Dänemark), einem volatilen Anästhetikum, anästhesiert. Anschließend wurde eine große Laparatomie vorgenommen. Aus der Vena cava inferior wurden Blutproben für die Bestimmung von Na^+ , K^+ , Cl^- , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} gesamt, Kreatinin, Harnstoff und Osmolalität gewonnen. Die rechte Niere wurde rasch entfernt und seziiert. Somit erhielten wir Präparate des Nierenkortex zusammen mit dem äußeren Streifen des äußeren Marks (Kortex), dem inneren Streifen des äußeren Marks (inner stripe of outer medulla, ISOM), und des inneren Marks. Diese Präparate

wurden umgehend für spätere Western Blot-Analysen aufbereitet (wie unten beschrieben). Die linke Niere wurde mittels retrograder Perfusion fixiert (wie unten beschrieben).

Protokoll 2:

Wir führten ein zweites Tierexperiment mit Gentamicin behandelten Ratten ($n=10$) und Kontrolltieren ($n=7$) durch. In diesem Tiermodell war der Aufbau der gleiche wie in Protokoll 1, mit dem Unterschied, dass die mit Gentamicin behandelten Ratten nun eine niedrigere Dosis intramuskulär erhielten (1x40 mg/kg Körpergewicht/d, Hexamycin, Durascan Mediacal Products A/S, Odense, Dänemark, Vnr. 089540). Die Kontrollratten erhielten nur das Vehiculum (i.e. steriles NaCl 0,9%, intramuskulär).

3.2 Clearancestudien und Uringlukosemessung:

Wir führten Clearanceuntersuchungen über die letzten 24 Stunden der Experimente in Protokoll 1 und Protokoll 2 durch. Am letzten Tag der Tierexperimente wurde allen Ratten jeweils 2 ml Blut unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran abgenommen. Das Blut wurde in ein heparinisiertes Röhrchen für die weitere Bestimmung der Plasmaelektrolyte und der Plasmaosmolalität gegeben. Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium, Magnesium, Gesamtcalcium, Kreatinin sowie die Kreatininkonzentration im Urin wurden anschließend gemessen (Vitros 950, Johnson & Johnson, Raritan, NJ, USA). Die Konzentrationen von Natrium, Kalium, Magnesium, Gesamtcalcium im Urin wurden mittels Flammenphotometrie bestimmt (Eppendorf FCM6341, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg). Die Osmolalität von Plasma und Urin bestimmten wir durch das Standardverfahren der Gefrierpunktserniedrigung (Advanced Osmometer, model 3900, Advanced Instruments, Norwood, MA, USA und Osmomat 030-D,

Gonotec, Berlin). Glukosespiegel im Urin wurden qualitativ mit dem Multistix (Bayer, Bayer Denmark, Lyngby, Dänemark) bestimmt.

3.3 Semiquantitative Western Blot-Analysen:

Der sezierte Nierenkortex (der Gewebe aus Kortex und dem äußeren Streifen des äußeren Nierenmarks enthält), der innere Streifen des äußeren Marks und das innere Mark wurden in eiskalter Isolationslösung homogenisiert (Ultra-Turrax T8 homogenizer, IKA Labortechnik, Staufen). Diese Isolationslösung enthielt 0,3 M Sucrose, 25 mM Imidazol, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 8,5 μ M Leupeptin, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), pH 7,2. Die Homogenate wurden bei 4° Celsius mit 4000 g zentrifugiert, um noch vollständige Zellen, Zellkerne und Mitochondrien zu entfernen. Der Überstand wurde abpipettiert und auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Gesamtproteinkonzentration gemessen (Pierce BCA protein assay reagent kit, Pierce, Rockford, IL, USA). Um in allen Proben die gleiche Proteinkonzentration zu erhalten, wurden die Proben entsprechend mit Isolationslösung angeglichen. Danach lösten wir alle Proben in einer Pufferlösung, die Natriumdodecylsulfat enthält, und lagerten sie anschließend bei -20° Celsius. Um die gleiche Proteinkonzentration der einzelnen Proben sicherzustellen, färbten wir ein Gel mit Coomassie Blau zur Quantifizierung des Proteingehaltes der einzelnen Proben. Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese („SDS-PAGE“) verwendeten wir 9%- und 12%-Polyacrylamidgele. Der Proteintransfer erfolgte durch Elektrophorese (BioRad Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) auf Nitrozellulosemembranen (Hybond ECL RPN3032D, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Anschließend erfolgte die Blockung der Blots mit Milchpulver 5% in PBS-T (80 mM Na₂HPO₄, 20mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) für eine

Stunde. Danach inkubierten wir die Membranen mit dem Primärantikörper bei 4° Celsius über Nacht. Anschließend wurde die Antikörper-Antigen-Reaktion mit einem Meerrettichperoxidase konjugierten sekundären Antikörper (P447 oder P448, verdünnt 1:3000; DAKO, Glostrup, Dänemark) und Chemolumineszenz (ECL oder ECL + plus) sichtbar gemacht und photographische Filme (Hyperfilm, ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) entsprechend belichtet. Die richtige Bandengröße wurde mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers ermittelt (Precision Plus Protein Standards, All Blue, Catalog No. 161-0373, BioRad). Die Dichte der Banden wurde densitometrisch quantifiziert; zuvor wurden die Filme eingescannt. Die Messergebnisse sind als relative Menge zwischen den Gruppen dargestellt. ECL Filme mit Banden im linearen Bereich wurden mit einem AGFA Scanner (ARCUS II) eingelesen. Die Dichte der Banden wurde mit Hilfe der Densitometrie der parallel angefertigten und mit Coomassie gefärbten Gele korrigiert.

3.4 Immunhistochemie:

Nachdem die Ratten anästhesiert waren, wurde die Aorta abdominalis kanüliert. Darüber wurde retrograd Fixationslösung perfundiert, während ein Ausfluss durch Eröffnen der Vena cava inferior geschaffen wurde. Zunächst wurde das Blut mit kalter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,4) aus den Nieren für 15 Sekunden herausgespült, dann wechselten wir zu kaltem Paraformaldehyd 3% in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) für 3 Minuten. Anschließend wurde die Niere entfernt und in 2 bis 3 mm dicke transversale Stücke geschnitten, die sofort für eine Stunde in oben genannte Fixationslösung getaucht wurden (Immersionsfixation). Danach folgte dreimaliges Waschen für jeweils 10 Minuten mit 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4). Anschließend wurde den Gewebestücken

durch abgestufte Ethanollösungen Wasser entzogen. Daraufhin lagerten wir sie über Nacht in Xylen. Nach Einbetten in Paraffin fertigten wir 2 µm Schnitte mit einem Rotationsmikrotom (Leica Micorosystems A/S, Herlev, Dänemark) an.



Abbildung 5: Perfusionsfixation; man sieht die Kanüle in der Aorta abdominalis, über die die retrograde Perfusionsfixation erfolgt. Das Blut wird über die eröffnete Vena cava inferior herausgespült. Unter der nach oben geklappten Leber sieht man die bereits blutleere und mit Fixationslösung perfundierte linke („weiße“) Niere. Durch dieses Verfahren erhält man eine wesentlich bessere Qualität der histologischen Präparate im Vergleich zur alleinigen Immersionsfixation. Über einen Trichter inhalierte die Ratte Isofloran und Sauerstoff.

Die histologischen Schnitte wurden mit Xylen entwachst und in einer abgestuften Reihe von Ethanolbädern rehydriert. Die endogene Peroxidaseaktivität der histologischen Schnitte blockierten wir mit H_2O_2 in reinem Methanol für 10 Minuten. Anschließend tauchten wir die Präparate in eine „Target Retrieval Solution“ (1 mmol/l Tris, pH 9,0 mit 0,5 mM Ethylenglycol-bis (*b*-Aminoethylether) und erhitzen sie

für zehn Minuten in einer Mikrowelle. Um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren, versetzten wir die Schnitte nach dem Abkühlen mit NH_4Cl in PBS für 30 Minuten, gefolgt von 3x10 Minuten „PBS blocking-buffer“ (1% Rinderserumalbumin, 0,05% Saponin und 0,2% Gelatine). Danach inkubierten wir die histologischen Schnitte bei 4° Celsius über Nacht mit dem primären Antikörper. Dieser Antikörper wurde zuvor verdünnt mit PBS mit 0,1% Rinderserumalbumin und 0,3% Triton X-100. Am nächsten Morgen wuschen wir die Präparate dann 3x10 Minuten mit PBS-Waschpuffer (0,1% Rinderserumalbumin, 0,05% Saponin und 0,2% Gelatine). Dann folgte über eine Stunde die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase konjugierten sekundären Antikörper (goat anti-rabbit immunoglobulin, DAKO A/S, Glostrup, Dänemark). Nach 3x10 Minuten Spülen mit PBS-Waschpuffer wurde die Antikörper-Antigen-Reaktion mit einem braunen Chromogen sichtbar gemacht. Dies erfolgte durch zehnminütige Inkubation mit 0,05% 3, 3'-Diaminobenzidin Tetrachlorid (DAB, Kem-en Tek, Kopenhagen, Dänemark), verdünnt in destilliertem Wasser mit 0,1% H_2O_2 . Für die Gegenfärbung verwendeten wir Mayer's Hämatoxylin. Nach erneuter Dehydrierung der histologischen Präparate befestigten wir die Deckplättchen der Objektträger mit einem hydrophoben Agens (Eukitt, O Kindler GmbH & Co, Freiburg). Für die Lichtmikroskopie verwendeten wir ein Leica DMRE (Leica Microsystems A/S, Herlev, Dänemark).

Alle histologischen Präparate, die der mit Gentamicin behandelten Ratten und die der Kontrolltiere, wurden gleichzeitig verarbeitet.

3.5 Primäre Antikörper:

Wir verwendeten polyklonale Hasenantikörper, die bereits zuvor gut charakterisiert wurden, gegen folgende renale Salztransporter:

NHE3 [Fernandez-Llama et al., 1998]

NKCC2 [BSC-1, Kim et al., 1999]

NCC (TSC) [Kim et al., 1998]

ENaC-Untereinheiten: α -ENaC, β -ENaC und γ -ENaC [Masilamani et al., 1999].

Wir verwendeten einen monoklonalen Mausantikörper gegen:
CaSR [Awata, et al., 2001].

Ein monoklonaler Mausantikörper gegen die
 $\alpha 1$ -Untereinheit der Na-K-ATPase
wurde freundlicherweise von Dr. D. M. Fambrough von der Johns
Hopkins University Medical School zur Verfügung gestellt.

3.6 Statistiken:

Messwerte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.
Die Gruppen wurden mit Hilfe des unpaarigen t-Test verglichen.
 P -Werte $< 0,05$ betrachteten wir als signifikant.

4. Ergebnisse:

4.1 Gentamicin senkt die Urinkonzentration und steigert die Ausscheidung von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium

In beiden Studienprotokollen (Protokoll 1, Gentamicin 80 mg/kg/d und Protokoll 2, Gentamicin 40 mg/kg/d) wiesen alle mit Gentamicin behandelten Ratten signifikant erhöhte fraktionelle Exkretionen von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium auf (Tabelle 1 und 2). Darüber hinaus zeigten in beiden Protokollen die mit Gentamicin behandelten Ratten eine erhöhte Urinausscheidung und eine erniedrigte Urinosmolalität (Tabelle 1 und 2), was auf eine verminderte Urinkonzentration hinweist.

In Protokoll 1, 24 Stunden nach der letzten hoch dosierten Injektion von Gentamicin, wurden plasmatische Gentamicin-Talspiegel $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ gemessen. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe trat bei mit Gentamicin behandelten Ratten eine ausgeprägte Glucosurie auf. Die mit 80 mg/kg/d Gentamicin behandelten Ratten hatten ebenfalls ein polyurisches Nierenversagen mit dreifach erhöhtem Plasmakreatinin und signifikant verminderter renaler Kreatininclearance. Tabelle 1 fasst die funktionellen Daten von Protokoll 1 zusammen.

In Protokoll 2 konnten keine messbaren Gentamicin-Talspiegel 24 Stunden nach der letzten niedriger dosierten Gentamicingabe festgestellt werden. Weder die mit Gentamicin behandelten, noch die Kontrollratten in Protokoll 2 hatten eine Glukosurie. Die mit Gentamicin behandelten Ratten hatten eine signifikant erniedrigte Kreatininclearance, wenn auch weniger ausgeprägt im Vergleich zu Protokoll 1. Die Plasma-Kreatinin-Spiegel waren jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Tabelle 2 fasst die funktionellen Daten von Protokoll 2 zusammen.

Tabelle 1: Funktionelle Parameter von Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d)

	GM (n=10)	Kontrolle (n=7)
P-Gentamicin Talspiegel (µg/ml)	2,5 ± 0,5 **	<0,5
U-Glukose-STIX (mmol/l)	22,2 ± 2,3 **	negativ
CRCL (ml/min)	0,4 ± 0,05 **	1,2 ± 0,1
Urinausscheidung (µl/min)	14,4 ± 1,7 **	6,9 ± 1
P-Osm (mosm/kg H ₂ O)	316 ± 2,3 **	305 ± 1,1
U-Osm (mosm/kg H ₂ O)	864 ± 72 **	2002 ± 300
P-Cr (µmol/l)	109,6 ± 12,2 **	33,3 ± 1,9
P-Na (mmol/l)	134,1 ± 1,4	136,1 ± 1,4
P-K (mmol/l)	4,3 ± 0,1	4,0 ± 0,2
P-Mg (mmol/l)	1,4 ± 0,03 **	1,1 ± 0,05
P-Ca gesamt (mmol/l)	2,7 ± 0,02 **	2,4 ± 0,03
FE-Na (%)	1,8 ± 0,2 **	0,6 ± 0,05
FE-K (%)	178,1 ± 19,9 **	66,8 ± 6,8
FE-Mg (%)	23,9 ± 4,6 **	0,7 ± 0,1
FE-Ca (%)	8,8 ± 0,9 **	0,4 ± 0,1
U-Na/K	0,29 ± 0,01	0,3 ± 0,01

CRCL, Creatinin-Clearance; FE-Ca, fraktionelle Exkretion von Calcium im Urin; FE-K, fraktionelle Exkretion von Kalium im Urin; FE-Mg, fraktionelle Exkretion von Magnesium im Urin; FE-Na, fraktionelle Exkretion von Natrium im Urin; GM, Gentamicin; P-Ca gesamt, Plasma-Gesamt-Calcium; P-Cr, Plasma-Creatinin; P-Gentamicin Talspiegel, Plasma-Gentamicin Talspiegel 24 h nach letzter Injektion; P-K, Plasma-Kalium; P-Mg, Plasma-Magnesium; P-Na, Plasma-Natrium; P-Osm, Plasma-Osmolalität; U-Glukose-STIX, Urin-Glukose gemessen durch Urin-STIX; Urinausscheidung, Sammelurin 24 h nach letzter Injektion; U-Osm, Urin-Osmolalität; U-Na/K, Urin-Na/K-Ratio.

Messwerte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

GM n=10, Kontrolle n=7.

Messwerte wurden am letzten Tag des Experimentes (Tag 7) bestimmt.

**P<0,01 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tabelle 2: Funktionelle Parameter von Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d)

	GM (n=10)	Kontrolle (n=7)
P-Gentamicin Talspiegel (µg/ml)	<0,5	<0,5
U-Glukose-STIX (mmol/l)	negativ	negativ
CRCL (ml/min)	1,1 ± 0,1 **	1,4 ± 0,04
Urinausscheidung (µl/min)	10,8 ± 0,7 **	7,2 ± 0,7
P-Osm (mosm/kg H ₂ O)	303 ± 1,4	302 ± 1,5
U-Osm (mosm/kg H ₂ O)	1359 ± 85 **	2103 ± 217
P-Cr (µmol/l)	33,7 ± 3,8	24,4 ± 0,6
P-Na (mmol/l)	135,9 ± 0,4	135,3 ± 0,6
P-K (mmol/l)	5,2 ± 0,2 **	6,3 ± 0,2
P-Mg (mmol/l)	0,9 ± 0,04	0,8 ± 0,03
P-Ca gesamt (mmol/l)	2,3 ± 0,05	2,4 ± 0,1
FE-Na (%)	0,8 ± 0,06 *	0,5 ± 0,1
FE-K (%)	72,2 ± 8,6 **	29,8 ± 6,1
FE-Mg (%)	15,4 ± 1,1 **	1,8 ± 0,7
FE-Ca (%)	2,3 ± 0,2 **	0,7 ± 0,2
U-Na/K	0,37 ± 0,02	0,31 ± 0,02

CRCL, Creatinin-Clearance; FE-Ca, fraktionelle Exkretion von Calcium im Urin; FE-K, fraktionelle Exkretion von Kalium im Urin; FE-Mg, fraktionelle Exkretion von Magnesium im Urin; FE-Na, fraktionelle Exkretion von Natrium im Urin; GM, Gentamicin; P-Ca gesamt, Plasma-Gesamt-Calcium; P-Cr, Plasma-Creatinin; P-Gentamicin Talspiegel, Plasma-Gentamicin Talspiegel 24 h nach letzter Injektion; P-K, Plasma-Kalium; P-Mg, Plasma-Magnesium; P-Na, Plasma-Natrium; P-Osm, Plasma-Osmolalität; U-Glukose-STIX, Urin-Glukose gemessen durch Urin-STIX; Urinausscheidung, Sammelurin 24 h nach letzter Injektion; U-Osm, Urin-Osmolalität; U-Na/K, Urin-Na/K-Ratio.

Messwerte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

GM n=10, Kontrolle n=7.

Messwerte wurden am letzten Tag des Experimentes (Tag 7) bestimmt.

*P<0,05, **P<0,01 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

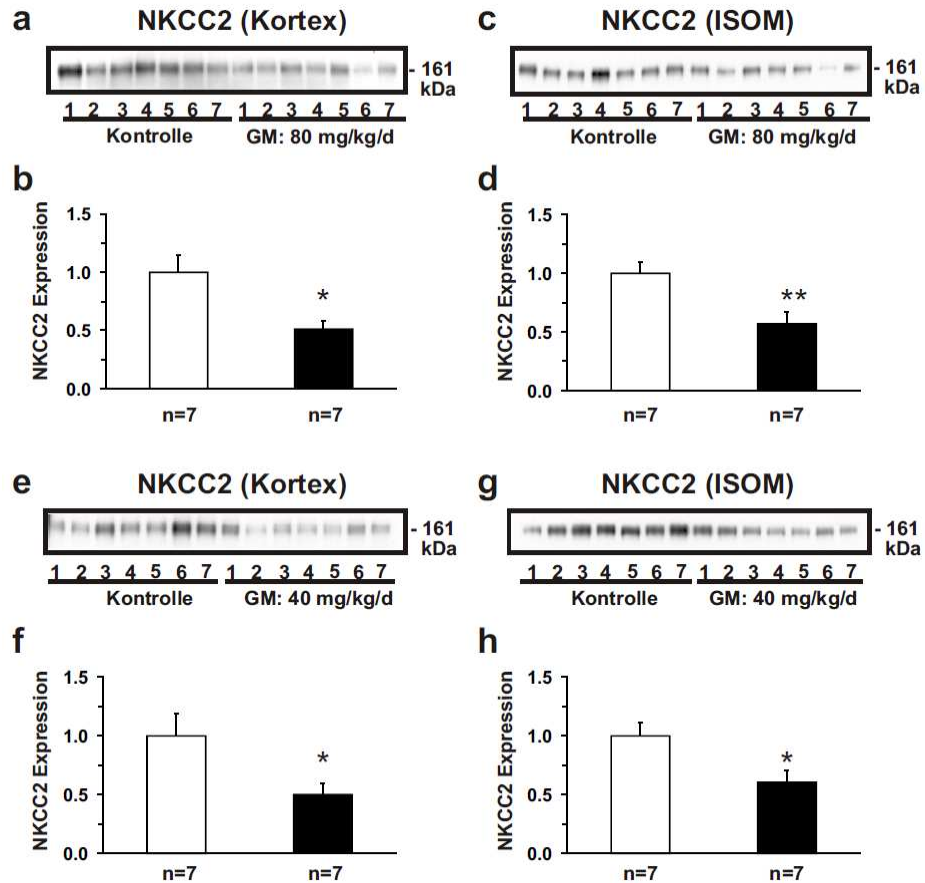
4.2 Renale Expression von NKCC2

Wir untersuchten die renale Proteinexpression von NKCC2 im Kortex und inneren Streifen des äußeren Marks (ISOM) durch semiquantitative Western Blot-Analysen. In Protokoll 1 war die NKCC2-Expression der mit Gentamicin behandelten Ratten im Kortex auf $51\pm 7\%$ im Vergleich zu den Kontrollen, $P<0,05$ (Abbildung 6a und b, Tabelle 3) signifikant reduziert und im ISOM auf $57\pm 7\%$ vermindert im Vergleich zu den Kontrollen, $P<0,01$ (Abbildung 6c und d, Tabelle 3). In Protokoll 2 war die NKCC2-Expression in den mit Gentamicin behandelten Ratten dementsprechend herabgesetzt: Im Kortex auf $50\pm 10\%$ im Vergleich zu den Kontrollen, $P<0,05$ (Abbildung 6e und f, Tabelle 4) und im ISOM auf $60\pm 10\%$ im Vergleich zu den Kontrollen, $P<0,05$ (Abbildung 6g und h, Tabelle 4).

Übereinstimmend mit den Western Blots zeigte die Immunhistochemie der in Paraffin eingebetteten Nierenschnitte eine verminderte Immunperoxidasefärbung von NKCC2 in den mit Gentamicin behandelten Ratten. In den Kontrollratten (Protokoll 1) war die ausgeprägte Immunperoxidasefärbung von NKCC2 mit den apikalen Plasmamembrandomänen im kortikalen TAL (Pfeile in Abbildung 7a) und im ISOM mit den apikalen Plasmamembrandomänen des medullären TAL (Pfeile in Abbildung 7c) assoziiert. Im Gegensatz dazu war die Intensität der Immunperoxidasereaktion von NKCC2 bei den Ratten, die Gentamicin (80 mg/kg/d) erhalten hatten, im Vergleich zu den Kontrollen merklich reduziert, und zwar sowohl im kortikalen als auch im medullären TAL (Pfeile in Abbildung 7b und d). Ebenso war in Protokoll 2 (40 mg/kg/d Gentamicin) die Immunfärbung von NKCC2 bei den Ratten, die Gentamicininjektionen erhalten hatten, im Vergleich zu den Kontrollen im kortikalen und im medullären TAL vermindert (Pfeile in Abbildung 7e und g).

Abbildung 6:

Semiquantitative Western Blots von Proteinhomogenaten aus Kortex und ISOM, jeweils von Kontrollen und mit Gentamicin behandelten Ratten, Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d) und Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d).



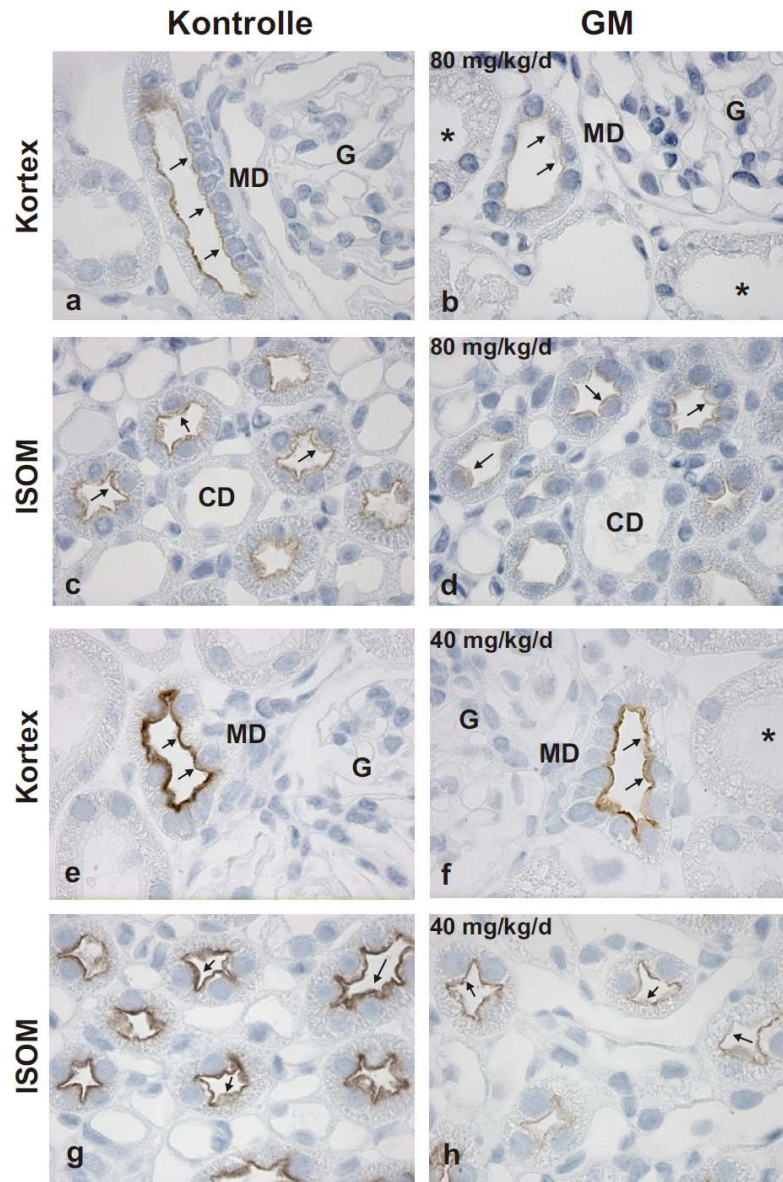
(a-d) In mit Gentamicin behandelten Ratten (Protokoll 1) war die NKCC2 Proteinexpression im Kortex und ISOM im Vergleich zu den Kontrollen deutlich vermindert.

(e-h) In mit Gentamicin behandelten Ratten (Protokoll 2) war die NKCC2 Proteinexpression im Kortex und ISOM im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert.

Die Messergebnisse (b, d, f und h) sind als relative Menge zwischen den Gruppen dargestellt.

Abbildung 7:

Immunhistochemie von NKCC2 im cTAL und mTAL in Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d) und Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d) .



Durch Gentamicin wird die Immunperoxidasereaktion von NKCC2 herabgesetzt: im cTAL (**b** und **f**, Pfeile) im Vergleich zu den Kontrollen (**a** und **e**, Pfeile) und im mTAL (**d** und **h**, Pfeile) im Vergleich zu den Kontrollen (**c** und **g**, Pfeile). MD, Macula densa; G, Glomerulus; Asterisk markiert den PT (Feld **b** und **f**); Pfeile markieren die Immunperoxidasereaktion von NKCC2 im cTAL und mTAL.

4.3 Renale Expression von NHE3

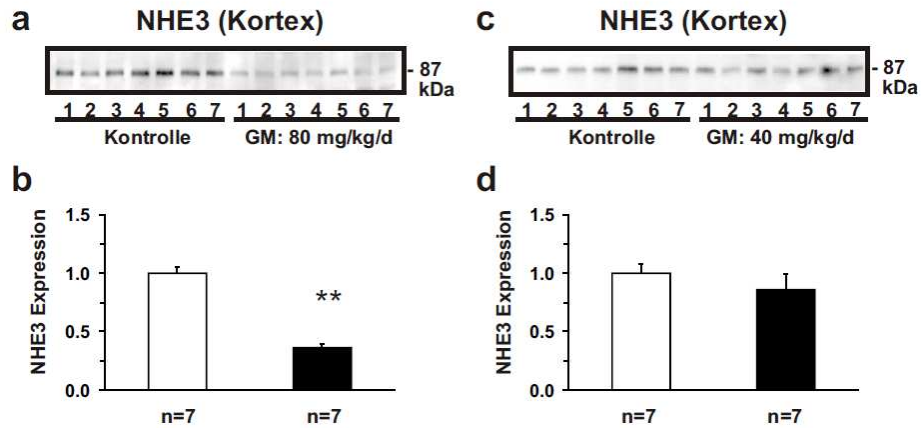
Wir untersuchten mögliche Änderungen der NHE3-Expression im Kortex und ISOM. In Protokoll 1 zeigte die semiquantitative Western Blot-Analyse eine signifikant herunterregulierte Proteinexpression von NHE3 im Kortex der mit Gentamicin behandelten Versuchstiere auf $57\pm 5\%$ gegenüber den Kontrollen, $P < 0,01$ (Abbildung 8a und b, Tabelle 3). Im Gegensatz dazu war die Expression von NHE3 im ISOM unverändert (Tabelle 3). In Protokoll 2 gab es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Proteinexpression von NHE3 im Kortex (Abbildung 8c und d, Tabelle 4) oder ISOM (Tabelle 4).

Die Immunhistochemie bestätigte diese Ergebnisse. In Protokoll 1, im Nierenkortex der Kontrollratten, war die Immunoperoxidasefärbung von NHE3 mit den apikalen Plasmamembrandomänen der proximalen Tubuli (Pfeile in Abbildung 9a) und des kortikalen TAL (Asterisk in Abbildung 9a) assoziiert. Die Immunhistochemie der mit 80 mg/kg/d Gentamicin behandelten Ratten zeigte eine verminderte Färbung für NHE3 in den proximalen Tubuli (Pfeile in Abbildung 9b), aber keine Änderungen der Immunfärbung im kortikalen TAL (Asterisk in Abbildung 9b). Lichtmikroskopisch imponierte ein Tubulusschaden und Zelltod bei Ratten, die Gentamicin erhalten hatten (Protokoll 1). Die Tubulusnekrose war besonders ausgeprägt in den gewundenen Abschnitten der proximalen Tubuli (Abbildung 7b und 9b), weniger in den geraden Abschnitten. Nekrotische Zellen waren von der Basalmembran gelöst und befanden sich im Tubuluslumen. Des Weiteren kam es zur Zerstörung des Bürstensaums (P in Abbildung 9b) sowie fokal zum Verlust einzelner Zellen im proximalen Tubulus (P in Abbildung 9b). Im ISOM der Nieren der Kontrollen konnte eine NHE3 Immunoperoxidasefärbung in den apikalen Domänen des medullären TAL (T in Abbildung 9c) und dem dünnen Teil der Henle-Schleife demonstriert werden. Die Intensität der Immunfärbung für

NHE3 war in mit Gentamicin behandelten Ratten unverändert (Abbildung 9d) im Vergleich zu den Kontrollen.

Abbildung 8:

Semiquantitative Western Blots von Proteinhomogenaten aus dem Kortex.



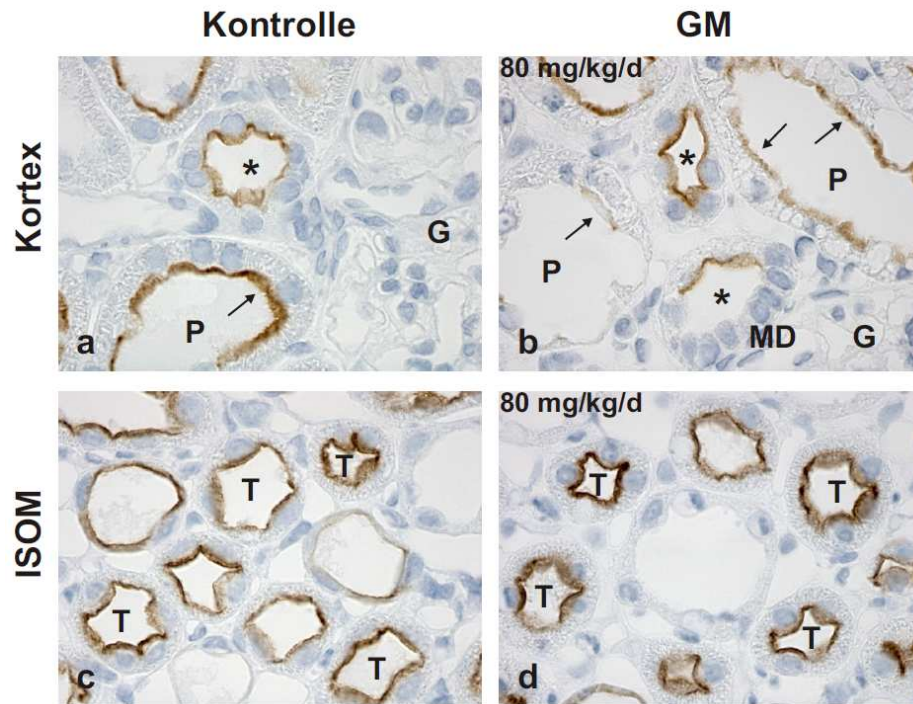
(a und b) In Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d) wurde die Expression von NHE3 durch Gentamicin herunterreguliert.

(c und d) In Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d) blieb die Expression von NHE3 unverändert.

Die Messergebnisse (b und d) sind als relative Menge zwischen den Gruppen dargestellt.

Abbildung 9:

Immunhistochemie von NHE3 (PT, cTAL und mTAL) von mit Gentamicin (80 mg/kg/d) behandelten Ratten und Kontrollen.



In Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d) führt Gentamicin zu schweren morphologischen Veränderungen der proximalen Tubuli (P in Feld **b**). Man erkennt eine Vakuolisierung und eine Zerstörung von Teilen des Bürstensaums, die mit einer verminderter Immunperoxidase-reaktion von NHE3 (**b**, Pfeile) im Vergleich zu den Kontrollen (Feld **a**, P, Pfeile) einhergeht. Im cTAL (Felder **a** und **b**, Asterisk) bleibt die Immunperoxidase-reaktion von NHE3 unverändert. Ebenfalls bleibt die Immunperoxidase-reaktion von NHE3 im mTAL (T in Feld **c** und **d**) unverändert.

MD, Macula densa; G, Glomerulus; P, proximaler Tubulus; Asterisk, cTAL; Pfeile markieren die Immunperoxidase-reaktion von NHE3 im PT.

4.4 Renale Expression der Na-K-ATPase

Western Blots der α_1 -Untereinheit der Na-K-ATPase von Kortex und ISOM zeigten eine signifikant niedrigere Proteinexpression bei mit Gentamicin behandelten Ratten (Protokoll 1) im Vergleich zu den Kontrollen. Im Kortex war die Expression auf $68\pm 8\%$ im Vergleich zu den Kontrollen, $P < 0,05$ (Abbildung 10a und b, Tabelle 3) und im ISOM auf $66\pm 7\%$, $P < 0,01$ (Abbildung 10c und d, Tabelle 3), herabgesetzt. Im Gegensatz dazu war in Protokoll 2 die Expression der α_1 -Untereinheit der Na-K-ATPase weder im Kortex (Abbildung 10e und f, Tabelle 4), noch im ISOM (Abbildung 10g und h, Tabelle 4) verändert im Vergleich zu den Kontrollratten.

4.5 Renale Expression von NCC

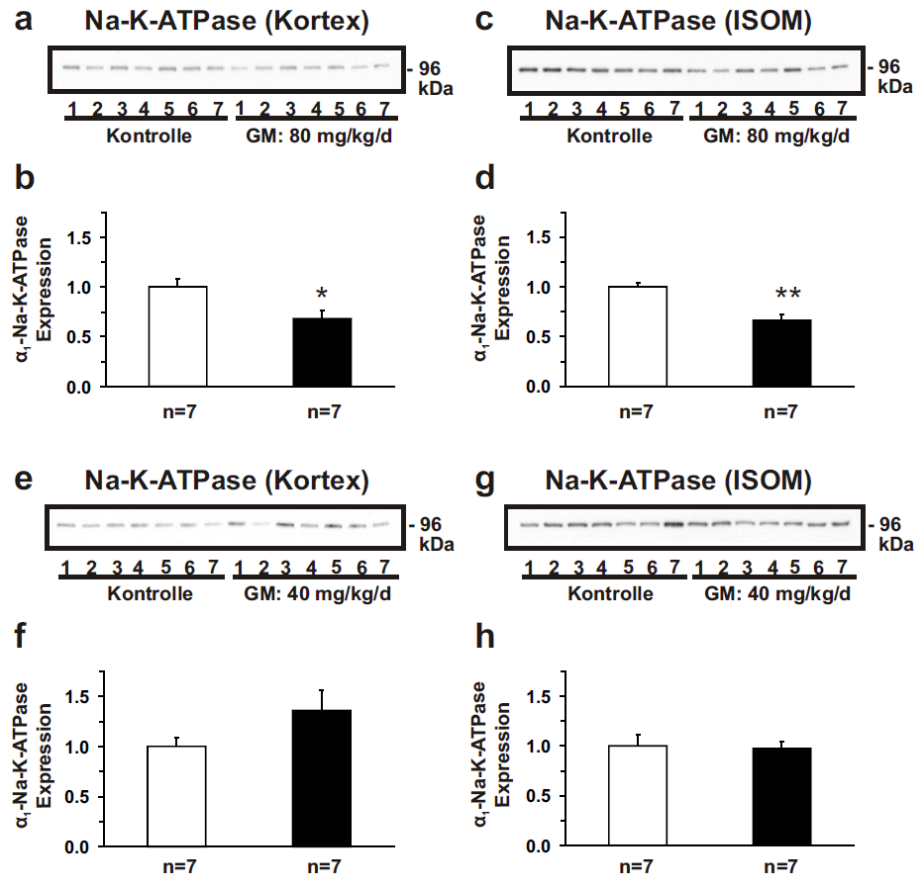
Die semiquantitative Western Blot-Analyse ergab eine unveränderte Proteinexpression von NCC in Ratten mit und ohne Gentamicininjektion in Protokoll 1 (Tabelle 3) und Protokoll 2 (Tabelle 4).

4.6 Renale Expression von ROMK

Im ISOM bestimmten wir die relative Proteinmenge von ROMK mittels semiquantitativer Western Blot-Analyse. Die ROMK-Expression war unverändert bei mit Gentamicin behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen in Protokoll 1 (Tabelle 3) und Protokoll 2 (Tabelle 4).

Abbildung 10:

Semiquantitative Western Blots von Proteinhomogenaten aus Kortex und ISOM.



In Protokoll 1 verursacht Gentamicin 80 mg/kg/d eine herabgesetzte Expression der Na-K-ATPase im Kortex (**a** und **b**) und ISOM (**c** und **d**) im Vergleich zu den Kontrollen. In Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d) blieb die Expression der Na-K-ATPase im Kortex (**e** und **f**) und ISOM (**g** und **h**) unverändert.

Die Messergebnisse (b, d, f und h) sind als relative Menge zwischen den Gruppen dargestellt.

Tabelle 3: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d)

	GM (n=10)	Kontrolle (n=7)
<i>Kortex</i>		
NKCC2	51 ± 7 *	100 ± 15
NHE3	36 ± 4 **	100 ± 5
Na-K-ATPase	68 ± 8 *	100 ± 8
NCC	88 ± 24 *	100 ± 8
CaSR	197 ± 25 **	100 ± 13
α-ENaC	153 ± 14 **	100 ± 8
β-ENaC	164 ± 8 **	100 ± 4
γ-ENaC	197 ± 11 **	100 ± 20
<i>ISOM</i>		
NKCC2	57 ± 10 **	100 ± 9
NHE3	59 ± 10	100 ± 18
Na-K-ATPase	66 ± 7 **	100 ± 5
ROMK	109 ± 15	100 ± 7
CaSR	160 ± 18 *	100 ± 15
β-ENaC	179 ± 15 **	100 ± 6
γ-ENaC	158 ± 9 **	100 ± 9

CaSR, Calcium-Sensing Rezeptor; GM, Gentamicin; NCC, thiazid-sensitiver Na-Cl Kotransporter; NHE3, Typ 3 Na/H Austauscher; NKCC2, Bumetanid-sensitiver Na-K-2Cl Kotransporter; Kortex, enthält Gewebe aus dem Kortex und dem äußeren Streifen des äußeren Nierenmarks; ISOM, innerer Streifen des äußeren Nierenmarks.

Messwerte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

GM n=10, Kontrolle n=7.

*P<0,05, **P<0,01 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tabelle 4: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d)

	GM (<i>n</i> =10)	Kontrolle (<i>n</i> =7)
<i>Kortex</i>		
NKCC2	50 ± 10 *	100 ± 19
NHE3	86 ± 13	100 ± 8
Na-K-ATPase	136 ± 20	100 ± 9
NCC	89 ± 5	100 ± 6
CaSR	107 ± 9	100 ± 5
α-ENaC	110 ± 16	100 ± 11
β-ENaC	129 ± 19	100 ± 18
γ-ENaC	143 ± 24	100 ± 17
<i>ISOM</i>		
NKCC2	60 ± 10 *	100 ± 11
NHE3	87 ± 16	100 ± 26
Na-K-ATPase	97 ± 7	100 ± 12
ROMK	78 ± 23	100 ± 18
CaSR	98 ± 6	100 ± 4
β-ENaC	173 ± 9 **	100 ± 6
γ-ENaC	131 ± 7 **	100 ± 6

CaSR, Calcium-Sensing Rezeptor; GM, Gentamicin; NCC, thiazid-sensitiver Na-Cl Kotransporter; NHE3, Typ 3 Na/H Austauscher; NKCC2, Bumetanid-sensitiver Na-K-2Cl Kotransporter; Kortex, enthält Gewebe aus dem Kortex und dem äußeren Streifen des äußeren Nierenmarks; ISOM, innerer Streifen des äußeren Nierenmarks.

Messwerte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

GM *n*=10, Kontrolle *n*=7.

P*<0,05, *P*<0,01 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

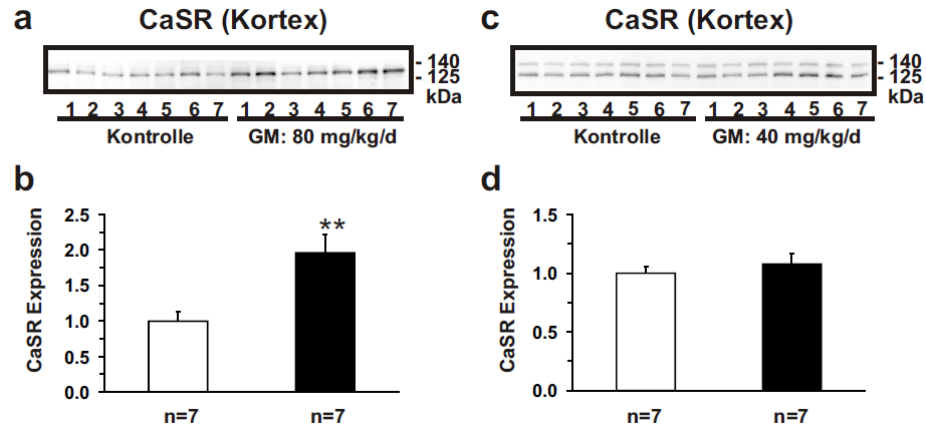
4.7 Renale Expression des CaSR

Die Proteinexpression des CaSR wurde im renalen Kortex und ISOM von mit Gentamicin behandelten Tieren und Kontrollratten bestimmt. In Protokoll 1 ergaben die semiquantitativen Western Blots eine vermehrte CaSR-Expression sowohl im Kortex, $197\pm 25\%$ gegenüber Kontrollen, $P<0,01$ (Abbildung 11a und b, Tabelle 3), als auch im ISOM, $160\pm 18\%$ im Vergleich zu den Kontrollen, $P<0,05$ (Tabelle 3). Im Gegensatz dazu war die Proteinexpression des CaSR in Protokoll 2 bei Ratten, denen Gentamicin injiziert wurde, im Vergleich zu den Kontrollen im Kortex (Abbildung 11c und d, Tabelle 4) und ISOM (Tabelle 4) unverändert.

Die immunhistochemische Analyse bestätigte diese Ergebnisse. Die Immunperoxidasefärbung war mit der basolateralen Membrandomäne im TAL (Abbildung 12a und b) assoziiert. Die Gentamicinbehandlung in Protokoll 1 bewirkte eine verstärkte Immunreaktion im kortikalen TAL (Pfeile in Abbildung 12b).

Abbildung 11:

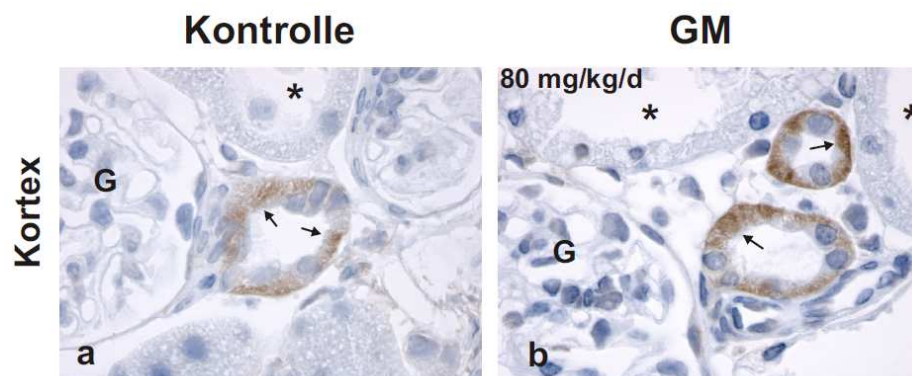
Semiquantitative Western Blots von Proteinhomogenaten aus Kortex.



Bei Ratten, die mit 80 mg/kg/d Gentamicin behandelt wurden (Protokoll 1), war die Proteinexpression des CaSR im Kortex (**a** und **b**) hochreguliert; sie blieb unverändert im Kortex (**c** und **d**) nach der Behandlung mit Gentamicin 40 mg/kg/d (Protokoll 2). Die Messergebnisse (b und d) sind als relative Menge zwischen den Gruppen dargestellt.

Abbildung 12:

Immunhistochemie des CaSR im cTAL von Ratten nach Gentamicingabe (80 mg/kg/d) und Kontrollen.



Durch Gentamicin wird die Immunperoxidaserreaktion von CaSR (**b**, Pfeile) im Vergleich zu Kontrollen (**a**, Pfeile) gesteigert. G, Glomerulus, Asterisk markiert den PT und die Pfeile die Färbung gegen CaSR im cTAL.

4.8 Renale Expression von ENaC (α -, β -, γ -Untereinheit)

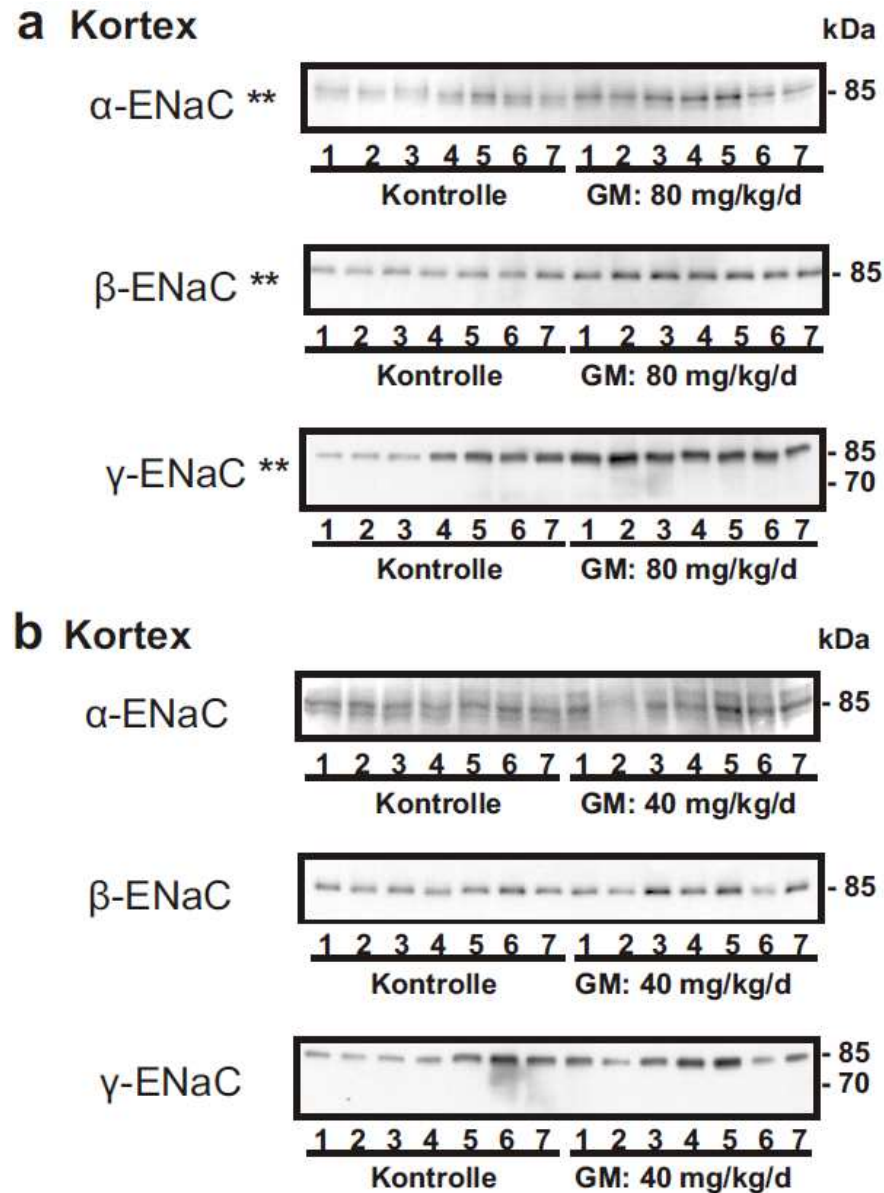
In Protokoll 1 wurde die α -ENaC-Expression im Kortex bei den mit Gentamicin behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant hochreguliert, $153 \pm 14\%$, $P < 0,01$ (Abbildung 13a, Tabelle 3). Die Proteinexpression der β -ENaC-Untereinheit war signifikant erhöht nach Gentamicininjektion: Im Kortex auf $164 \pm 8\%$, $P < 0,01$ (Abbildung 13a, Tabelle 3) und im ISOM auf $179 \pm 15\%$, $P < 0,01$ (Tabelle 3). Ebenfalls war die γ -ENaC-Expression deutlich bei mit Gentamicin behandelten Ratten gesteigert: Im Kortex (85 kDa-Bande) $197 \pm 11\%$ gegenüber den Kontrollen, $P < 0,01$ (Abbildung 13a, Tabelle 3); die 70 kDa-Bande war nicht sichtbar. Dementsprechend war auch im ISOM nach Gentamicinbehandlung die γ -ENaC-Expression (85 kDa-Bande) signifikant erhöht auf $158 \pm 9\%$ gegenüber den Kontrollen, $P < 0,01$ (Tabelle 3); wiederum war die 70 kDa-Bande kaum sichtbar.

In Protokoll 2 gab es im Kortex keinen Unterschied in der Proteinexpression von α -, β - oder γ -ENaC zwischen den mit Gentamicin behandelten Ratten und den Kontrollen (Abbildung 13b, Tabelle 4). Im Gegensatz dazu konnte im ISOM nach Gentamicininjektion eine signifikant höhere Expression von β -ENaC ($173 \pm 9\%$, $P < 0,01$, Tabelle 4) und γ -ENaC ($131 \pm 7\%$, $P < 0,01$, Tabelle 4) gezeigt werden.

Die immunhistochemische Analyse von β -ENaC in Protokoll 1 (ohne Abbildung) zeigte nach Gentamicinbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verstärkte Immunperoxidasereaktion im Verbindungsstück (CNT), im kortikalen Sammelrohr (CCD) und im Sammelrohr des äußeren Nierenmarks (OMCD). Parallel dazu war die Immunperoxidasefärbung von γ -ENaC in Protokoll 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker im CNT, CCD (Abbildung 14a-d) und OMCD (ohne Abbildung).

Abbildung 13:

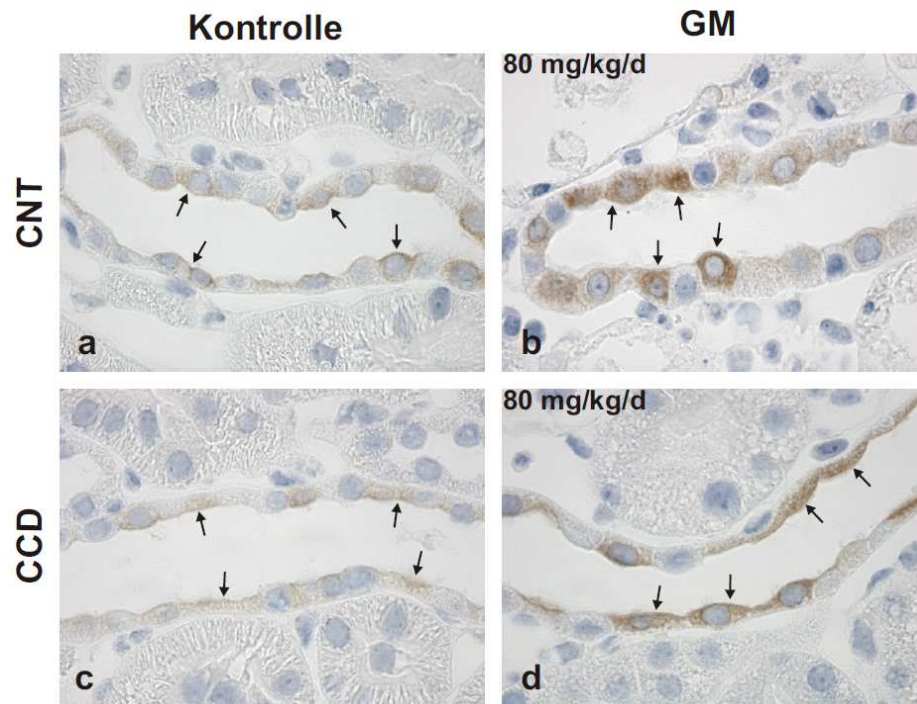
Semiquantitative Western Blots von Proteinhomogenaten aus Kortex.



- (a) In Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d) war die Expression von α -, β - und γ -ENaC bei den mit Gentamicin behandelten Ratten signifikant erhöht. Allerdings war die 70 kDa-Bande des γ -ENaCs fast nicht erkennbar, was auf eine geringe Aldosteronaktivität hinweist.
- (b) In Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d) blieb die Expression von α -, β - und γ -ENaC unverändert.

Abbildung 14:

Immunhistochemie von γ -ENaC im Verbindungsstück (CNT) und kortikalen Sammelrohr (CCD) in Protokoll 1.



Bei Ratten, die mit 80 mg/kg/d Gentamicin behandelt wurden, war die Immunperoxidasereaktion von γ -ENaC verstärkt im CNT (**b**, Pfeile) im Vergleich zu den Kontrollen (**a**, Pfeile) und im CCD (**d**, Pfeile) im Vergleich zu den Kontrollen (**c**, Pfeile).

5. Diskussion:

In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass die Injektion von Gentamicin bei Ratten mit einer erhöhten Exkretion von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium sowie mit einer verminderten Urinkonzentrationsfähigkeit der Nieren assoziiert ist. Lichtmikroskopisch imponierte ein schwerer Schaden der proximalen Tubuli und Zeichen des Zellunterganges bei Ratten, die nach Protokoll 1 mit 80 mg/kg/d Gentamicin behandelt wurden. Wie aus früheren Studien bekannt, entwickelten diese Ratten im Verlauf zusätzlich eine Glukosurie. Übereinstimmend damit konnten wir eine verminderte Proteinexpression wichtiger Salztransporter des proximalen Tubulus (NHE3 und Na-K-ATPase) beobachten. Dies war nicht der Fall, wenn die Ratten mit einer niedrigeren Gentamicindosis von 40 mg/kg/d behandelt wurden.

Nach der Verabreichung von hohen Gentamicindosen war die Expression mehrerer Salztransporter im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) erniedrigt, bei der Behandlung mit niedriger dosiertem Gentamicin nur selektiv die von NKCC2.

Die Expression der ENaC-Untereinheiten blieb entweder unverändert oder war hochreguliert. Dies ist am ehesten ein Kompensationsmechanismus für die reduzierte Salzreabsorption in den vorangestellten Nephronsegmenten.

Die verminderte NKCC2-Expression im TAL trägt vermutlich zum beobachteten Konzentrationsdefekt bei, da dadurch die Aufrechterhaltung des hypertonen medullären Interstitiums behindert wird. Die herabgesetzte Expression von NKCC2 (und das dem zu Folge verminderte lumenpositive Spannungsgefälle im TAL) verursacht wahrscheinlich die beschriebene Hypermagnesiurie und Hypercalciurie. Das transepitheliale Spannungsgefälle ist die Antriebskraft für den passiven parazellulären Transport der beiden

Kationen. Die erniedrigte Expression von Salztransportern im proximalen Tubulus und von NKCC2 tragen vermutlich zur gesteigerten renalen Salzexkretion bei.

Diese Schlussfolgerungen sollen nun im Detail diskutiert werden.

5.1 Gentamicin senkt die Urinkonzentration und steigert die Ausscheidung von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium

Alle mit Gentamicin behandelten Ratten in den Protokollen 1 und 2 hatten eine erhöhte renale Ausscheidung von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium. Dies konnten wir durch die erhöhten fraktionellen Exkretionen von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium abschätzen. Eine mit Aminoglycosiden assoziierte Hypermagnesiurie ist immer mit einer Hypercalciurie vergesellschaftet [Elliott et al. 1992, Keating et al. 1977]. Somit ist es wahrscheinlich, dass Aminoglycoside die tubuläre Reabsorption dieser beiden polyvalenten Kationen in den Nephronsegmenten stören, in denen Magnesium und Calcium parallel reabsorbiert werden: dem dicken Teil der Henle-Schleife und/oder dem distalen Konvolut [Dai et al. 2001]. Wir untersuchten unter anderem die Hypothese, dass eine verminderte Expression von NKCC2 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (wie wir es bei den mit Gentamicin behandelten Ratten sehen) zur Entstehung der beobachteten Hypermagnesiurie und Hypercalciurie beiträgt, da die durch eine erniedrigte NKCC2-Expression gestörte Salzresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife das dort herrschende lumenpositive Spannungsgefälle senkt. Mehrere vorangegangene Studien konnten zeigen, dass der renale Magnesiumverlust, zusammen mit dem Verlust von Natrium, Kalium, Calcium und Phosphat, bereits unter therapeutischen Dosen von Gentamicin und unmittelbar nach Infusion des Medikaments auftritt. Diese Elektrolytverluste treten lange vor anderen Zeichen

renaler Dysfunktion oder strukturellen Schäden der Niere auf [Parson et al. 1997, Foster et al. 1992, Giapros et al. 2004, von Vigier et al. 2000].

5.2 Dysregulation renaler Salztransporter und des Calcium-Sensing Rezeptors im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife

Wir konnten zeigen, dass eine Behandlung mit relativ hohen Gentamicindosen (Protokoll 1) mit einer signifikant verminderten Expression des NKCC2 und der Na-K-ATPase im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife assoziiert ist, wohingegen die Expression von NHE3 und ROMK unverändert bleibt. Im Gegensatz dazu war nach der Gabe niedrigerer Dosen von Gentamicin (Protokoll 2) selektiv die Expression von NKCC2 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife herabgesenkt, die des NHE3, der Na-K-ATPase und von ROMK unverändert. Da in beiden Protokollen alle mit Gentamicin behandelten Ratten eine erhöhte renale Ausscheidung von Natrium aufwiesen, ist es wahrscheinlich, dass die verminderte NKCC2-Expression eine wesentliche Rolle bei der herabgesetzten Salzreabsorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und bei der erhöhten renalen Salzausscheidung spielt. Der damit verbunden Abfall des lumenpositiven Spannungsgefälles erschwert die Magnesium- und Calciumresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und führt zu einer Hypermagnesiurie und Hypercalciurie.

Die Aktivierung des CaSR hemmt die passive Wiederaufnahme von Magnesium und Calcium im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und den aktiven Transport im distalen Tubuluskonvolut [Bapty et al. 1998, Bapty et al. 1998, Hebert et al. 1996, Kang et al. 2000]. Weitere Studien demonstrierten, dass durch Aktivierung des

CaSR sowohl die NaCl- als auch die Calciumausscheidung in Ratten und Menschen gesteigert wird [Hebert 1996, El-Hajj et al. 1998]. Die in dieser Arbeit beobachtete Hochregulation der CaSR-Expression in Ratten nach hochdosierter Gentamicininjektion (Protokoll 1, 80 mg/kg/d) unterstreicht den Einfluss des CaSR auf eine verminderte Salzreabsorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und auf eine daraus resultierende verminderte Rückresorption divalenter Kationen. In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass eine experimentell induzierte Hypercalciämie mit einer erhöhten CaSR-Expression und einer verminderten NKCC2-Expression einhergeht [Wang et al. 2004]. Eine weitere Arbeit zeigte, dass Aminoglycosidantibiotika, wie zum Beispiel Gentamicin, als polyvalente Kationen wirken und den CaSR aktivieren [McLarnon 2002].

Zusammen mit den Erkenntnissen anderer Studien unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass eine Aktivierung des CaSR (eine vermehrte Expression) die Salzreabsorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife senkt und dadurch das dort herrschende lumenpositive Spannungsgefälle vermindert. Da letzteres die treibende Kraft für den passiven parazellulären Transport divalenter Kationen darstellt, würde es folglich zu einer reduzierten Rückresorption von Magnesium und Calcium in diesem Nephronsegment kommen [Brown et al. 2001]. Übereinstimmend damit verursachen Schleifendiuretika wie zum Beispiel Furosemid eine Natriurese mit Hypermagnesiurie und Hypercalciurie.

Es sind zumindest zwei second messenger Systeme bekannt, die durch den CaSR aktiviert werden und den NaCl-Transport im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife beeinflussen können: Erstens die Reduktion des zellulären cAMP und zweitens die Aktivierung von P₄₅₀ und die daraus resultierende Bildung von 20-HETE [Hebert 2004]. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife sind NaCl-,

Magnesium- und Calciumtransport wahrscheinlich abhängig von cAMP. Hormone, die intrazellulär den cAMP-Spiegel erhöhen (wie zum Beispiel Vasopressin, Parathormon, Glucagon und Calcitonin), steigern die Wiederaufnahme von NaCl, Magnesium und Calcium im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife [de Rouffignac et al. 1994]. Desmopressin (DDAVP), ein V_2 -selektiver Vasopressinagonist, erhöht die Expression von NKCC2 [Kwon et al. 2005, Kim et al. 1999]. Der V_2 -Rezeptor aktiviert die Adenylatcyclase und somit könnte die vermehrte NKCC2-Expression durch Vasopressin eine Folge von cAMP-Bildung sein. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass im murinen *NKCC2*-Gen, *SLC12A1*, ein cAMP-regulatorisches Element identifiziert werden konnte [Igarashi et al. 1996]. Außerdem inhibiert 20-HETE NKCC2 [Amlal et al. 1996], apikale Kaliumkanäle [Wang et al. 1996] und die Na-K-ATPase [Escalante et al. 1991]. Dies hat wiederum eine verminderte NaCl-Rückresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife zur Folge. Zusätzlich zu diesen Beobachtungen, entwickeln Patienten mit stark aktivierenden Mutationen des *CaSR*-Gens (autosomal dominante Hypocalciämie, OMIM +601199) einen dem Bartter Syndrom ähnlichen Phänotyp mit renalem Salz- und Wasserverlust und hypokaliämischer Alkalose [Vargas-Poussou et al. 2002, Watanabe et al. 2002].

In den Protokollen 1 und 2 war die Expression von β - und γ -ENaC im ISOM erhöht. Sehr wahrscheinlich ist dies ein Kompensationsmechanismus für die gestörte Salzwiederaufnahme im proximalen Tubulus und dicken Teil der Henle-Schleife. Allerdings sprechen eine unveränderte Urin-Na/K-Ratio [Bailey et al. 2001] und die unveränderte NCC-Expression [Kim et al. 1998] gegen eine Aktivierung des Aldosteronrezeptors in diesen Tiermodellen. Die Na/K-Ratio im Urin wird im Allgemeinen zur Abschätzung der Aldosteronaktivität im distalen Nephron und im Sammelrohr

verwendet. Das heißt, bei erhöhter Aldosteronwirkung wäre die Na/K-Ratio erniedrigt und bei geringerer Aldosteronaktivität entsprechend erhöht.

Es sind also weitere Studien notwendig, um die erhöhte Expression der ENaC-Untereinheiten zu verstehen.

5.3 Verminderte Urinkonzentration in mit Gentamicin behandelten Ratten

Wir beobachteten eine Verminderung der Urinkonzentration bei Ratten, die mit Gentamicin behandelt wurden. Eine frühere Studie zeigte eine verminderte Expression von Aquaporin-1 und Aquaporin-3 bei Ratten nach Gentamicingabe [Lee et al. 2001]. Darüber hinaus konnte die Bildung von cAMP zwar mit Forskolin, aber nicht mit Vasopressin stimuliert werden. Forskolin ist ein bekannter direkter Stimulator der Adenylatcyclase. Vasopressin stimuliert die Adenylatcyclase nach Bindung an einen Rezeptor über einen G-Protein-gekoppelten Signalweg. Somit sprechen diese Daten dafür, dass Gentamicin die cAMP-Bildung auf G-Proteinebene stört. Weitere Studien deuten daraufhin, dass Gentamicin die Bildung von cAMP im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (äußeres Mark) und im Sammelrohr hemmt [Kidwell et al. 1990]. Ob eine solche Störung der cAMP-Bildung an der Verminderung der NKCC2-Expression beteiligt ist, wurde allerdings noch nicht direkt untersucht. Dennoch ist anzunehmen, dass eine herabgesetzte Expression von NKCC2 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife zu einer geringeren Salzreabsorption in diesem Nephronsegment und somit zu einer reduzierten Gegenstromkonzentrierung führt. Das erschwert die Bildung des hyperosmolaren Interstitiums im Nierenmark und schränkt demzufolge die Konzentrierung des Harns ein.

5.4 Dysregulation renaler Salztransporter und des Calcium-Sensing Rezeptors im Kortex

Gentamicin wird im Glomerulum frei filtriert und ausschließlich im proximalen Tubulus reabsorbiert. Somit akkumuliert es in der Nierenrinde. In Protokoll 1, in dem den Ratten eine hohe Dosis Gentamicin verabreicht wurde, wurde die Expression der Salztransporter im proximalen Tubulus vermindert. Dies überprüften wir durch Western Blot-Analysen und Immunhistochemie von NHE3, Na-K-ATPase und NKCC2. In der Lichtmikroskopie zeigte sich, dass die Expression von NHE3 nur im proximalen Tubulus, aber nicht im kortikalen dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife vermindert war. Zusammen mit der deutlichen Glukosurie, die ja ausschließlich durch die hohen Gentamicindosen verursacht wurde, weist das auf eine schwere Zellschädigung im proximalen Tubulus hin. Dies lässt vermuten, dass die toxische Zellschädigung die Ursache für die verminderte NHE3 Expression im proximalen Tubulus ist. In Protokoll 2, in dem den Ratten eine niedrigere Gentamicindosis verabreicht wurde, war ausschließlich die NKCC2 Expression im Kortex vermindert. Die Expression von NHE3 und der Na-K-ATPase blieb dabei unverändert. Dies bestätigten wir sowohl durch die Western Blot-Analysen, als auch durch die Immunhistochemie.

In beiden Protokollen blieb die Expression von NCC unverändert. Vorangegangene funktionelle Studien zeigten, dass Aldosteron die Expression von NCC steigert [Kim et al. 1998]. Die unveränderte Urin-Na/K-Ratio bei den mit Gentamicin behandelten Ratten, verglichen mit Kontrollen, deutet darauf hin, dass der Aldosteronrezeptor in den aldosteronsensitiven Nephronsegmenten nicht aktiviert wurde. Dies kann wiederum die unveränderte NCC Expression erklären. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen von ENaC unterstützen diese Annahme. Nur in Protokoll 1 wurde die Expression von α -, β -, γ -ENaC hochreguliert. Die 70 kDa Bande der

γ -Untereinheit des ENaCs war dabei aber fast nicht erkennbar. Wie bekannt, bewirkt Aldosteron eine qualitative Veränderung der γ -Untereinheit von ENaC, nämlich eine Änderung des Molekulargewichtes von 85 kDa auf 70 kDa [Masilamani et al. 1999]. Somit ist eine gesteigerte Aldosteronaktivität nicht wahrscheinlich. Die Ursachen für die gesteigerte Expression von ENaC bleiben unklar.

Die CaSR Proteinexpression war in Protokoll 1 erhöht. Ursächlich könnte eine starke Aktivierung durch Gentamicin selbst sein. Wie erwähnt, fungieren Aminoglycoside wie Gentamicin als polyvalente Kationen, die den CaSR direkt aktivieren können. Der CaSR könnte somit durchaus eine Rolle für die verminderte Expression von NKCC2 und der Na-K-ATPase sowie für die herabgesetzte Salzreabsorption spielen, die mit einem renalem Magnesium- und Calciumverlust einhergeht. Es bleibt jedoch unklar, ob die geminderte Expression des NKCC2 und der Na-K-ATPase im Kortex in Protokoll 1 eine Folge der nephrotoxischen Wirkung von Gentamicin ist oder durch eine starke Aktivierung des CaSR vermittelt wurde. Vorangegangene Experimente lokalisieren den CaSR auch am Boden der apikalen Bürstensaummembranen proximaler Tubuluszellen [Riccardi et al. 1998]. Darüber hinaus zeigen neuere Experimente mit OK (opossum kidney) Zellen (eine proximale Tubulus-Zelllinie) sowie mit CaSR-transfizierten HEK-293 Zellen, dass die Überstimulation des CaSR bei der nephrotoxischen Wirkung von Aminoglycosiden eine Rolle spielt [Ward et al. 2005]. Die Immunhistochemie dieser Studie zeigt eine CaSR-Proteinexpression ausschließlich im kortikalen und medullären dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. Dennoch schließt dies die Lokalisation und die funktionelle Rolle des CaSR im proximalen Tubulus nicht aus. Um dies zu ermitteln, sind weitere Untersuchungen notwendig.

6. Schlussfolgerung:

Bei Ratten, die mit Gentamicin behandelt wurden (in niedrigerer Dosis, 40 mg/kg/d), könnte die selektiv herabgesetzte Expression von NKCC2 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife eine Rolle für die verminderte Urinkonzentration spielen. Da NKCC2 eine Schlüsselfunktion für die Rückresorption von Natrium und die Aufrechterhaltung des lumenpositiven Spannungsgefälles (der treibenden Kraft des passiven Magnesium- und Calciumtransportes) übernimmt, hat die verringerte NKCC2 Expression durch Gentamicin wahrscheinlich auch eine Bedeutung für die Entwicklung der Hypermagnesiurie und der Hypercalciurie.

Dies geht einher mit dem sowohl klinisch als auch experimentell zu beobachtenden Verlust von Magnesium und Calcium durch die Gabe von Schleifendiuretika wie zum Beispiel Furosemid.

7. Zusammenfassung:

Ziel dieser Arbeit war es die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für den renalen Verlust von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} in mit Gentamicin (GM) behandelten Ratten zu untersuchen. In zwei Tiermodellen injizierten wir männlichen Wistar Ratten GM (40 bzw. 80 mg/kg/d über 7 Tage; GM-40 bzw. GM-80). Wir untersuchten die Expression von NHE3, Na-K-ATPase, NKCC2, ROMK, NCC, α -, β -, γ -ENaC und des CaSR in der Niere durch Western Blot-Analysen und Immunhistochemie.

Sowohl in GM-40 als auch in GM-80 war die fraktionelle Exkretion von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} im Urin erhöht. Die Konzentration des Urins war im Gegensatz dazu vermindert. Im Nierenkortex zusammengenommen mit dem äußeren Streifen des äußeren Nierenmarks (Kortex) des ersten Tiermodells (GM-80) war die Proteinexpression von NHE3, Na-K-ATPase und NKCC2 vermindert, die Expression von NCC unverändert und die von CaSR im Vergleich zu den Kontrollen gesteigert. Im inneren Streifen des äußeren Nierenmarks (ISOM) war bei GM-80 die Expression von NKCC2 und Na-K-ATPase herabgesetzt, CaSR war hochreguliert und die Expression von NHE3 und ROMK unverändert. Im zweiten Tiermodell (GM-40) war die Proteinexpression von NKCC2 im Kortex und ISOM vermindert. Unverändert war die Expression von NHE3, Na-K-ATPase, CaSR, ROMK und NCC sowohl im Kortex als auch ISOM.

Die Immunhistochemie bestätigte die verminderte Expression von NKCC2 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) in beiden Tiermodellen, GM-80 und GM-40. Die Western Blot-Analysen und die Immunhistochemie zeigten eine gesteigerte Expression von α -, β -, γ -ENaC im Kortex bei GM-80, aber nicht bei GM-40.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verminderte Expression von NKCC2 im TAL durch die Gabe von niedriger dosiertem Gentamicin (40 mg/kg/d) eine entscheidende Rolle für die gesteigerte renale Exkretion von Mg^{2+} und Ca^{2+} und für die Entstehung des Harnkonzentrationsdefektes spielt. Bei hoch dosierter Gentamicingabe trägt sowohl die verminderte Expression der Salztransporter des proximalen Tubulus als auch des TAL dazu bei.

8. Abstract:

We aimed to investigate the molecular mechanisms underlying the renal wasting of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} in gentamicin (GM)-treated rats. Male Wistar rats were injected with GM (40 or 80mg/kg/day for 7 days, respectively; GM-40 or GM-80). The expression of NHE3, Na–K-ATPase, NKCC2, ROMK, NCC, α -, β - and γ -ENaC, and CaSR was examined in the kidney by immunoblotting and immunohistochemistry.

Urinary fractional excretion of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} was increased and urinary concentration was decreased in both GM-40 and GM-80 rats. In cortex and outer stripe of outer medulla (cortex) in GM-80 rats, the expression of NHE3, Na–K-ATPase, and NKCC2 was decreased; NCC expression was unchanged; and CaSR was upregulated compared to controls. In the inner stripe of outer medulla (ISOM) in GM-80 rats, NKCC2 and Na–K-ATPase expression was decreased, whereas CaSR was upregulated, and NHE3 and ROMK expression remained unchanged. In GM-40 rats, NKCC2 expression was decreased in the cortex and ISOM, whereas NHE3, Na–K-ATPase, CaSR, ROMK, and NCC abundance was unchanged in both cortex and ISOM. Immunoperoxidase labeling confirmed decreased expression of NKCC2 in the thick ascending limb (TAL) in both GM-80- and GM-40-treated rats. Immunoblotting and immunohistochemical analysis revealed increased expression α -, β - and γ -ENaC in cortex in GM-80 rats, but not in GM-40 rats.

These findings suggest that the decrease in NKCC2 in TAL seen in response to low-dose (40mg/kg/day) gentamicin treatment may play an essential role for the increased urinary excretion of Mg^{2+} and Ca^{2+} , and play a significant role for the development of the urinary concentrating defect, and increased urinary excretion of Na^+ and K^+ . At high-dose gentamicin, both proximal and TAL sodium transporter downregulation is likely to contribute to this.

9. Literaturverzeichnis:

ALEXANDRIDIS G, LIBEROPOULOS E, ELISAF M: Aminoglycoside-Induced Reversible Tubular Dysfunction. *Pharmacology* 67:118-120, 2003.

AMLAL H, LEGOFF C, VERNIMMEN C, *et al.*: Na(+)-K+(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransport in medullary thick ascending limb: control by PKA, PKC, and 20-HETE. *Am J Physiol* 271:C455-C463, 1996.

ARONSON PS: Role of ion exchangers in mediating NaCl transport in the proximal tubule. *Kidney Int* 49:1665-1670, 1996.

AWATA H, HUANG C, HANDLOGTEN ME, MILLER RT: Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *J Biol Chem* 276:34871-34879, 2001.

BAILEY MA, UNWIN RJ, SHIRLEY DG: In vivo inhibition of renal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat stimulates collecting duct sodium reabsorption. *Clin Sci (Lond)* 101:195-198, 2001.

BAPTY BW, DAI LJ, RITCHIE G, *et al.*: Extracellular Mg²⁺(+)- and Ca²⁺(+)-sensing in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int* 53:583-592, 1998.

BAPTY BW, DAI LJ, RITCHIE G, *et al.*: Mg²⁺/Ca²⁺ sensing inhibits hormone-stimulated Mg²⁺ uptake in mouse distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* 275:F353-F360, 1998.

BENNETT WM: Drug nephrotoxicity: an overview. *Renal Failure* 19:221-224, 1997.

BIBER J, CUSTER M, MAGAGNIN S, *et al.*: Renal Na/Pi-cotransporters. *Kidney Int* 49:981-985, 1996.

BROWN EM, MACLEOD RJ: Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 81:239-297, 2001.

CANESSA CM, SCHILD L, BUELL G, *et al.*: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367:463-467, 1994.

DAI LJ, RITCHIE G, KERSTAN D, *et al.*: Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol Rev* 81:51-84, 2001.

DE ROUFFIGNAC C, QUAMME G: Renal magnesium handling and its hormonal control. *Physiol Rev* 74:305-322, 1994.

DUC C, FARMAN N, CANESSA CM, *et al.*: Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 127:1907-1921, 1994.

ECELBARGER CA, TERRIS J, HOYER JR, *et al.*: Localization and regulation of the rat renal Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter, BSC-1. *Am J Physiol* 271:F619-F628, 1996.

EL-HAJJ FULEIHAN G, SEIFTER J, SCOTT J, BROWN EM: Calcium-Regulated Renal Calcium Handling in Healthy Men: Relationship to Sodium Handling. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2366-2372, 1998.

ELLIOTT WC, PATCHIN DS: Aminoglycoside-mediated calciuresis. *J Pharmacol Exp Ther* 262:151-156, 1992.

ESCALANTE B, ERLIJ D, FALCK JR, MCGIFF JC: Effect of cytochrome P450 arachidonate metabolites on ion transport in rabbit kidney loop of Henle. *Science* 251:799-802, 1991.

FERNANDEZ-LLAMA P, ANDREWS P, NIELSEN S, *et al.*: Impaired aquaporin and urea transporter expression in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome. *Kidney Int* 53:1244-1253, 1998.

FOSTER JE, HARPUR ES, GARLAND HO: An investigation of the acute effect of gentamicin on the renal handling of electrolytes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 261:38-43, 1992.

GIAPROS VI, CHOLEVAS VI, ANDRONIKOU SK: Acute effects of gentamicin on urinary electrolyte excretion in neonates. *Pediatr Nephrol* 19:322-325, 2004

GIEBISCH G, WANG W: Potassium transport: from clearance to channels and pumps. *Kidney Int* 49:1624-1631, 1996.

HAGER H, KWON TH, VINNIKOVA AK, *et al.*: Immunocytochemical and immunoelectron microscopic localization of alpha-, beta-, and gamma-ENaC in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F1093-F1106, 2001.

HEBERT SC, WANG WH: Structure and function of the low conductance KATP channel, ROMK. *Wien Klin Wochenschr* 109:471-476, 1997.

HEBERT SC, BROWN EM, HARRIS HW: Role of the Ca(2+)-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J Exp Biol* 200:295-302, 1997.

HEBERT SC: Extracellular calcium-sensing receptor: implications for calcium and magnesium handling in the kidney. *Kidney Int* 50:2129-2139, 1996.

HEBERT SC: Calcium and salinity sensing by the thick ascending limb: a journey from mammals to fish and back again. *Kidney Int Suppl*:S28-S33, 2004.

IGARASHI P, WHYTE DA, LI K, NAGAMI GT: Cloning and Kidney Cell-specific Activity of the Promoter of the Murine Renal Na-K-Cl Cotransporter Gene. *J Biol Chem* 271:9666-9674, 1996.

KALOYANIDES GJ: Renal pharmacology of aminoglycoside antibiotics. *Contrib Nephrol* 42:148-167, 1984.

KANG HS, KERSTAN D, DAI L, *et al.*: Aminoglycosides inhibit hormone-stimulated Mg²⁺ uptake in mouse distal convoluted tubule cells. *Can J Physiol Pharmacol* 78:595-602, 2000.

KASHGARIAN M, BIEMESDERFER D, CAPLAN M, FORBUSH B, III: Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int* 28:899-913, 1985.

KEATING MJ, SETHI MR, BODEY GP, SAMAAAN NA: Hypocalcemia with hypoparathyroidism and renal tubular dysfunction associated with aminoglycoside therapy. *Cancer* 39:1410-1414, 1977.

KIDWELL D, SUBRAMANIAM S, OTT C, JACKSON B: Impaired cyclic AMP generation in outer medullary tubules of gentamicin-treated rats. *Eur J Pharmacol* 191:489-492, 1990.

KIM GH, MASILAMANI S, TURNER R, *et al.*: The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14552-14557, 1998.

KIM GH, ECELBARGER CA, MITCHELL C, *et al.*: Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 276:F96-F103, 1999.

KIM GH, ECELBARGER CA, MITCHELL C, *et al.*: Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 276:F96-F103, 1999.

KWON TH, NIELSEN J, KNEPPER MA, *et al.*: Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases vasopressin-induced water reabsorption and AQP2 levels in NaCl-restricted rats. *Am J Physiol Renal Physiol*:00304, 2004

LEE J, YOO KS, KANG DG, *et al.*: Gentamicin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. *Jpn J Pharmacol* 85:391-398, 2001.

LOPEZ-NOVOA JM, QUIROS Y, VICENTE L, MORALES AI, LOPEZ-HERNANDEZ FJ: New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 2011 Jan;79(1):33-45. Epub 2010 Sep 22.

MASILAMANI S, KIM GH, MITCHELL C, *et al.*: Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104:R19-R23, 1999.

MCLARNON S, HOLDEN D, WARD D, *et al.*: Aminoglycoside antibiotics induce pH-sensitive activation of the calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 297:71-77, 2002.

MINGEOT-LECLERCQ MP, TULKENS PM: Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1003-1012, 1999.

MURER H, FORSTER I, HILFIKER H, *et al.*: Cellular/molecular control of renal Na/Pi-cotransport. *Kidney Int Suppl* 65:S2-10, 1998.

NIELSEN S, MAUNSBACH AB, ECELBARGER CA, KNEPPER MA: Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *Am J Physiol* 275:F885-F893, 1998.

OBERMULLER N, BERNSTEIN P, VELAZQUEZ H, *et al.*: Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol* 269:F900-F910, 1995

PALMER BH, HEINRICH WL: Toxic Nephropathy, in *Brenner & Rector's The Kidney, 7th Edition*, edited by Barry M.Brenner, Samuel A.Levine 2003.

PARSONS PP, GARLAND HO, HARPUR ES, OLD S: Acute gentamicin-induced hypercalciuria and hypermagnesiuria in the rat: dose-response relationship and role of renal tubular injury. *Br J Pharmacol* 122:570-576, 1997.

QUAMME GA: Effect of furosemide on calcium and magnesium transport in the rat nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 241:F340-F347, 1981.

RICCARDI D, HALL AE, CHATTOPADHYAY N, *et al.*: Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am J Physiol* 274:F611-F622, 1998.

SANDS JM, NARUSE M, BAUM M, *et al.*: Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 99:1399-1405, 1997.

SCHMITT R, ELLISON DH, FARMAN N, *et al.*: Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron. *Am J Physiol* 276:F367-F381, 1999.

SCHLINGMANN KP, KONRAD M, SEYBERTH HW: Genetics of hereditary disorders of magnesium homeostasis. *Pediatr Nephrol* 19:13-25, 2004.

SILVERBLATT FJ, KUEHN C: Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 15:335-345, 1979.

VANDEWALLE A, FARMAN N, MORIN JP, *et al.*: Gentamicin incorporation along the nephron: autoradiographic study on isolated tubules. *Kidney Int* 19:529-539, 1981.

VARGAS-POUSSOU R, HUANG C, HULIN P, *et al.*: Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 13:2259-2266, 2002.

VON VIGIER RO, TRUTTMANN AC, ZINDLER-SCHMOCKER K, *et al.*: Aminoglycosides and renal magnesium homeostasis in humans. *Nephrol Dial Transplant* 15:822-826, 2000.

WALDEGGER S, JENTSCH TJ: From tonus to tonicity: physiology of CLC chloride channels. *J Am Soc Nephrol* 11:1331-1339, 2000.

WANG W, LI C, KWON TH, *et al.*: Reduced expression of renal Na⁺ transporters in rats with PTH-induced hypercalcemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F534-F545, 2004.

WANG WH, LU M, HEBERT SC: Cytochrome P-450 metabolites mediate extracellular Ca(2+)-induced inhibition of apical K⁺ channels in the TAL. *Am J Physiol* 271:C103-C111, 1996.

WARD DT, MALDONADO-PEREZ D, HOLLINS L, RICCARDI D: Aminoglycosides Induce Acute Cell Signaling and Chronic Cell Death in Renal Cells that Express the Calcium-Sensing Receptor. *J Am Soc Nephrol* 16:1236-1244, 2005.

WATANABE S, FUKUMOTO S, CHANG H, *et al.*: Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet* 360:692-694, 2002.

XU JC, LYTLE C, ZHU TT, *et al.*: Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2201-2205, 1994.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Expression von NHE3 und NaP _i -2 entlang des Nephrons	9
Abbildung 2: Expression der Na-K-ATPase, NKCC2 und NCC entlang des Nephrons.	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transportmechanismen im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife	12
Abbildung 4: Stoffwechselkäfig („metabolic cage“)	16
Abbildung 5: Perfusionsfixation	20
Abbildung 6: Western Blots NKCC2	27
Abbildung 7: Immunhistochemie NKCC2	28
Abbildung 8: Western Blots NHE3	30
Abbildung 9: Immunhistochemie NHE3	31
Abbildung 10: Western Blots Na-K-ATPase	33
Abbildung 11: Western Blots CasR	37
Abbildung 12: Immunhistochemie CasR	37
Abbildung 13: Western Blots α -, β - und γ -ENaC	39
Abbildung 14: Immunhistochemie γ -ENaC	40

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktionelle Parameter von Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d)	24
Tabelle 2: Funktionelle Parameter von Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d)	25
Tabelle 3: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von Protokoll 1 (Gentamicin 80 mg/kg/d)	34
Tabelle 4: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von Protokoll 2 (Gentamicin 40 mg/kg/d)	35

12. Abkürzungen

BSC-1	Bumetanide-sensitive Cotransporter (=NKCC2)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calcium-sensing Rezeptor
CCD	Cortical collecting duct (kortikales Sammelrohr)
ClC-K	Chloride Channel-K (basolateraler Chloridkanal)
CNT	Connecting tubule (Verbindungsstück)
CRCL	Creatinin-Clearance
cTAL	Cortical thick ascending limb (kortikaler dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife)
DCT	Distal convoluted tubule (distales Tubuluskonvolut)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	Epithelial sodium channel (epithelialer Natriumkanal)
FE-Ca	Fraktionelle Exkretion von Calcium
FE-K	Fraktionelle Exkretion von Kalium
FE-Mg	Fraktionelle Exkretion von Magnesium
FE-Na	Fraktionelle Exkretion von Natrium
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney-Zellen
i.e.	<i>id est</i> , lateinisch für das ist, mit anderen Worten
IMCD	Inner medullary collecting duct (Sammelrohr im inneren Nierenmark)
ISOM	Inner stripe of outer medulla (innerer Streifen des äußeren Nierenmarks)
mTAL	Medullary thick ascending limb (medullärer dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife)
Na-K-ATPase	3 Na ⁺ /2K ⁺ -ATPase
NCC	Na-Cl Kotransporter (=TSC)
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger Typ 3 (Na ⁺ /H ⁺ Austauscher Typ 3)
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ Kotransporter (= BSC-1)

OK-Zellen	Opossum Kidney-Zellen
OMCD	Outer medullary collecting duct (Sammelrohr im äußeren Nierenmark)
OSOM	Outer stripe of outer medulla (äußerer Streifen des äußeren Nierenmarks)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
P-Ca gesamt	Plasma-Ca gesamt
P-Cr	Plasma Creatinin
P-K	Plasma Kalium
P-Mg	Plasma Magnesium
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
P-Na	Plasma Natrium
P-Osm	Plasma Osmolalität
PT	Proximaler Tubulus
ROMK	Kaliumkanal Kir 1.1
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-elektrophorese)
TAL	Thick ascending limb (dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife)
TSC	Thiazide-sensitive Cotransporter (= NCC)

13. Publikationen

13.1 Originalarbeiten:

1. **Sassen MC**, Jeck N, Klaus G. Can renal tubular hypokalemic disorders be accurately diagnosed on the basis of the diuretic response to thiazide? *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007 Oct;3(10):528-9. Epub 2007 Aug 14.
2. Huang C, Sindic A, Hill CE, Hujer KM, Chan KW, **Sassen M**, Wu Z, Kurachi Y, Nielsen S, Romero MF, Miller RT. Interaction of the Ca²⁺-sensing receptor with the inwardly rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Mar;292(3):F1073-81. Epub 2006 Nov 22.
3. **Sassen MC**, Kim SW, Kwon TH, Knepper MA, Miller RT, Frøkiaer J, Nielsen S. Dysregulation of renal sodium transporters in gentamicin-treated rats. *Kidney Int*. 2006 Sep;70(6):1026-37. Epub 2006 Jul 19.
4. Kim SW, Wang W, **Sassen MC**, Choi KC, Han JS, Knepper MA, Jonassen TE, Frøkiaer J, Nielsen S. Biphasic changes of epithelial sodium channel abundance and trafficking in common bile duct ligation-induced liver cirrhosis. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(1):89-98.
5. Kim SW, de Seigneux S, **Sassen MC**, Lee J, Kim J, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S. Increased apical targeting of renal ENaC subunits and decreased expression of 11betaHSD2 in HgCl₂-induced

nephritic syndrome in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Mar;290(3):F674-87. Epub 2005 Sep 27.

6. Schlingmann KP, **Sassen MC**, Weber S, Pechmann U, Kusch K, Pelken L, Lotan D, Syrrou M, Prebble JJ, Cole DE, Metzger DL, Rahman S, Tajima T, Shu SG, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. Novel TRPM6 mutations in 21 families with primary hypomagnesemia and secondary hypocalcemia. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Oct;16(10):3061-9.

7. Chubanov V, Waldegger S, Mederos y Schnitzler M, Vitzthum H, **Sassen MC**, Seyberth HW, Konrad M, Gudermann T. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2894-9. Epub 2004 Feb 19.

8. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, **Sassen M**, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet*. 2002 Jun;31(2):166-70.

13.2 Buch- und Fachzeitschriftenbeiträge:

„Kindliche Zyanose“ – und dann? Ein sichtbar kritisches Zeichen mit vielfältigen Ursachen; Rettungsdienst, Zeitschrift für präklinische Notfallmedizin. *S+K Verlag* November 2011.

Der Kindernotfall: Versorgung nach dem ABCDE-Schema; Kapitel Angeborene Herzfehler. *S+K Verlag* 2011.

14. Anhang

14.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Baum, Barth, Basler, Bien, Christiansen, Czubayko, Daut, Engel, Feuser, Fuhrmann, Fruhsdorfer, Geus, Görg, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Hesse, Kälble, Kern, Kim-Berger, Klaus, Klenk, Klingmüller, Klose, Konrad, Koolmann, Krieg, Lang, Lennartz, Leonhardt, Leppek, Maisch, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Rothmund, Schäfer, Schulz, Schulze, Seyberth, Schmidt, Stinner, Thomas, Töllner, von Wichert, Waldegger, Wagner, Werner, Westermann, Röhm, Schachtschabel, Seifert, Steiniger

Meine akademischen Lehrer in Aarhus waren die Herren:

Frøkiær und Nielsen

14.2 Lebenslauf

Name: Martin Christian Sassen
Geburtsdatum: 02.10.1974
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch

Ausbildungsweg:

10/2011 – jetzt	Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie, Marburg
11/2008 – jetzt	Notarzt am Zentrum für Notfallmedizin (NEF, Baby-ITW, Kinder-ITW, Ambulanzjet)
10/2005 – 10/2011	Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Marburg
1/2004 – 10/2005	Research fellow am Water and Salt Research Center, Aarhus, DK
5/2003 – 12/2003	Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Marburg
10/2001 – 5/2003	Arzt im Praktikum und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Marburg
10/1994 – 6/2001	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg und Tulane Medical School, Tulane University, New Orleans, USA
1994	Abitur (Prälat-Diehl-Schule, Gymnasium Groß-Gerau)

Weiterbildung:

2010	Prehospital Trauma Life Support (PHTLS)
2010	European Pediatric Life Support (EPLS): <i>Instruktorpotential</i>

2009	Advanced Life Support (ALS)
2009	DIVI Intensivtransportkurs
2008	Advanced Medical Life Support (AMLS)
2008	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
2008	Zusatzqualifikation Früh- und Neugeborenennotarzt

Forschung: Renaler Magnesium- und Salzverlust

Dozententätigkeit: Blockpraktikum Kinderheilkunde, Seminar
Pädiatrische Intensivmedizin und Pädiatrische
Gastroenterologie,
Praktikum Notfallmedizin 2,
Marburger Kompaktkurs Zusatzbezeichnung
Notfall-medicin,
Krankenpflegeschule, Fachweiterbildung
Intensivpflege und Anästhesie,
Mittelhessisches Rettungsdienstsymposium

Fremdsprachen: Englisch, Französisch, Dänisch

Mitgliedschaften: Mitglied der Gesellschaft für Pädiatrische
Nephrologie ,
Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und
Jugendmedizin

Stipendien: Stipendium der Prof. Dr. Adolf Schmidtman-
Stiftung 2008,
EMBO Short-term fellowship 2004

Preise: Else-Kröner-Fresenius-Preis der Gesellschaft für
Pädiatrische Nephrologie (2006)

14.3 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Günter Klaus für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung während der Arbeit. Besonders erwähnen möchte ich die stete Diskussionsbereitschaft und uneingeschränkte Möglichkeit und Ermutigung zur Eigenarbeit. Herr Professor Dr. Klaus zeigte mir immer vorbildlich, wie wichtig es ist die Verbindung zwischen den Grundlagen der Physiologie und der Klinik zu erkennen.

Herrn Professor Nielsen und Herrn Professor Frøkiær danke ich für die Möglichkeit den experimentellen Teil meiner Arbeit in Aarhus durchführen zu können sowie für die vielen Anregungen, fruchtbaren Diskussionen und das freundliche und entspannte Arbeitsklima. Sie wurden mir zu guten Freunden.

Frau Dr. Hea-Sook Kim-Berger danke ich für die uneingeschränkte und treue Freundschaft, die stete Unterstützung und liebevollen Aufmunterung von Beginn an. Sowohl als Ärztin als auch als Mensch war sie mir immer ein gutes Vorbild.

Herrn Privatdozenten Dr. Leonhardt danke ich dafür, dass er mir immer half das Wesentliche im Auge zu behalten und strukturiert zu arbeiten. Ich durfte viel von ihm lernen. Ich danke ihm für seine guten Ratschläge und sein offenes Ohr. Auch in schwierigen Zeiten stand er mir immer zur Seite.

Ich danke Dr. Soo Wan Kim herzlich für seine Freundschaft, die Unterstützung bei den Tierexperimenten sowie für seine konstruktive Kritik und die vielen guten Ratschlägen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Professor Tae-Hwan Kwon, Professor Mark Knepper, Dr. Martin Kömhoff, Professor Dr. Siegfried Waldegger, Dr. Nikola Jeck, Professor Dr. Martin Konrad und Dr. Karl Peter Schlingmann danke ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen anregenden Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Inger Merete Paulsen, Lotte Vallentin Holbech, Ida Maria Jalk, Gitte Kall, Helle Høyer, Zhila Nikrozi, Mette Vistisen und Dorte Wulff für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen und histologischen Techniken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, Dietlind und Winfried Sassen, weil sie mir das alles ermöglicht haben, stets wissen mich zu motivieren, mir immer liebevoll zur Seite stehen und an mich glauben.

Ganz herzlich danke ich meiner Schwester Annette, weil sie immer für mich da ist.

Ich danke Brian für seine bedingungslose Freundschaft.

Ein herzlicher Dank gilt auch meiner Freundin Verena, ohne die vieles nur halb so schön wäre.

14.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität-Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**„Dysregulation renaler Salztransporter in
mit Gentamicin behandelten Ratten“**

am Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Günter Klaus (Philipps-Universität Marburg) mit Unterstützung durch Herrn Prof. Søren Nielsen, MD, PhD, Herrn Prof. Jørgen Frøkiær, MD, PhD und Herrn Soo Wan Kim, MD (The Water and Salt Research Center, Aarhus University, Dänemark) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen, als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Sassen MC, Kim SW, Kwon TH, Knepper MA, Miller RT, Frøkiær J, Nielsen S (2006): Dysregulation of renal sodium transporters in gentamicin-treated rats. *Kidney Int.* 2006 Sep;70(6):1026-37. Epub 2006 Jul 19.

Marburg, den 28.03.2012

Martin Christian Sassen